

## ANTÍGENOS FÚNGICOS, CONTROLES POSITIVOS Y PLACAS DE INMUNODIFUSIÓN PARA SU UTILIZACIÓN EN LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN (ID)

Para su utilización en el sistema de anticuerpos fúngicos ID REF ID ID1001, Sistema de anticuerpos de *Candida* ID REF CA1001 Reactivos individuales y placas de inmunodifusión

### USO PROPUESTO

Los reactivos de inmunodifusión (ID, por sus siglas en inglés) están diseñados para detectar los anticuerpos del paciente dirigidos contra *Aspergillus*, *Blastomices*, *Candida*, *Coccidioides*, *Histoplasma* o *Paracoccidioides* en el suero del paciente para facilitar el diagnóstico de cada enfermedad respectiva.

### EXPLICACIÓN

*Aspergillus* spp; *Blastomices dermatitides*, *Candida* spp; *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* son los agentes causales de la micosis muy arraigada. El diagnóstico de estos hongos presenta un desafío para el laboratorio de microbiología y el médico. Radiográficamente, las lesiones producidas por hongos sistémicos (todos los mencionados anteriormente, a excepción de *Candida*) pueden ser difíciles de distinguir de otras enfermedades infecciosas (p. ej., *M. Tuberculosis*) o enfermedades neoplásicas (23). A menudo, los síntomas son apenas notables y pueden imitar diversas neumonías, sarcoidosis, cáncer y otras enfermedades. En cultivos e histológicamente los organismos pueden ser difíciles de demostrar, incluso después de repetidos intentos. A excepción de *Aspergillus* y *Candida*, el crecimiento es muy lento y requiere de 2 a 6 semanas (26). Con frecuencia, la serología ofrece la única evidencia disponible para guiar un tratamiento, sugerir un pronóstico o conducir a la selección de técnicas de diagnóstico más definitivas, tales como cultivo intensivo o biopsia (23). Por otra parte, la serología semicuantitativa, tales como la prueba de fijación del complemento (CF, por sus siglas en inglés) o la ID semicuantitativa, pueden proporcionar información importante sobre los efectos de la terapia (23,24). La prueba de ID es una prueba cualitativa o semicuantitativa empleada para la detección de la precipitación de anticuerpos en pacientes con supuesta micosis. Además, la prueba de ID es una técnica rápida y confiable que proporciona una presunta evidencia de infección. Los sueros anticomplementarios en la prueba de CF pueden comprobarse mediante el uso de esta técnica. La prueba de ID también proporciona datos específicos sobre las reacciones obtenidas por la prueba de CF. No se necesita un equipo costoso y la técnica es lo suficientemente simple para que se lleve a cabo en cualquier laboratorio, disponiendo así de una excelente herramienta de diagnóstico.

**TABLA 1: Pruebas de serodiagnóstico para anticuerpos en enfermedades micóticas**

Enfermedad	ID	CF	LA	EIA
<b>Aspergilosis</b>	X	X		
<b>Blastomycosis</b>	X	X		
<b>Candidiasis</b>	X			
<b>Coccidioidomicosis</b>	X	X	X	X
<b>Histoplasmosis</b>	X	X	X	
<b>Paracoccidioidomicosis</b>	X			

### ASPERGILOSIS:

Existen tres tipos de aspergilosis: aspergilosis invasiva (IA, por sus siglas en inglés), aspergilosis alérgica broncopulmonar (ABPA) y aspergiloma (19). La prueba de ID resulta muy útil en el diagnóstico de ABPA y aspergiloma, los dos tipos de aspergilosis observados en personas inmunocompetentes donde la infección puede relacionarse con un aumento de anticuerpos específicos (19). Se pueden encontrar precipitinas en >90 % de los pacientes con aspergiloma y en el 70 % de los pacientes con ABPA (26). En contraste con los huéspedes inmunocompetentes, el crecimiento de *Aspergillus* en los tejidos de un huésped inmunosuprimido no se relaciona con un aumento de títulos de anticuerpos anti-*Aspergillus*. El uso paralelo de las pruebas de ID y CF y los datos clínicos es un medio efectivo para el diagnóstico específico de Aspergilosis (Tabla 1) (33).

### BLASTOMICOSIS:

Deben solicitarse pruebas serológicas de blastomycosis cuando un paciente muestre signos de una infección respiratoria que progresa gradualmente o cuando las lesiones estén presentes en la piel, lo que constituye un signo frecuente de diseminación (26). La blastomycosis no tiene síntomas patognomónicos ni características radiológicas específicas. La prueba de ID de blastomycosis es la que se detectan los anticuerpos contra el antígeno "A" es específica (positiva en aproximadamente el 80 % de los casos comprobados por cultivo) y las reacciones positivas pueden ser la base para un tratamiento inmediato del paciente (26). El aumento de anticuerpos (es decir, el título) se relaciona con la actividad de la enfermedad (7). Sin embargo, las pruebas negativas no excluyen el diagnóstico de blastomycosis (26). Si se demuestran las precipitinas en la prueba de ID de blastomycosis, no es necesario realizar las pruebas de muestras de suero mediante CF (Tabla 1) (34).

## CANDIDIASIS:

La especie *Candida*, aunque usualmente considerada saprofitica, se conoce ahora como causante de enfermedad. Los regímenes de tratamiento actuales tales como antibióticos de amplio espectro, corticoesteroides y medicamentos citotóxicos han conducido a un aumento en la prevalencia de Candidiasis sistémica. Lamentablemente, se carece de rasgos clínicos únicos en la Candidiasis visceral y, con frecuencia, el diagnóstico no se efectúa *antemortem*. Un diagnóstico temprano y preciso es la clave para una terapia exitosa. Stallybrass (30) ha informado acerca de la importancia de la precipitación de anticuerpos contra *C. albicans* en sueros de pacientes con candidiasis sistémica o visceral a través de una prueba de ID. Los sueros de personas sanas y pacientes con candidiasis mucocutánea no arrojaron pruebas de ID positivas. La prueba de ID para anticuerpos es útil en el diagnóstico de candidiasis sistémica en huéspedes inmunocompetentes (26). Sin embargo, los pacientes inmunosuprimidos podrían aumentar una respuesta humoral inmune limitada o dejar de producir anticuerpos, por lo que una prueba de ID negativa no excluye la enfermedad (26). Debido a que estos hongos forman parte de la flora normal del cuerpo, su aislamiento podría no ser suficiente evidencia para el diagnóstico de laboratorio. Las pruebas serológicas proporcionan información adicional cuando un aumento en el título o un cambio en el número de precipitinas es más indicativo de infección que una única prueba positiva.

## COCCIDIOIDOMICOSIS:

*C. immitis* (aislados de California) y *C. posadasii* (aislados fuera de California) se encuentran predominantemente en el sudoeste de los Estados Unidos (11), América Central y América del Sur, pero el transporte moderno ha aumentado la probabilidad de infección para aquellas personas que visitan la región. El diagnóstico serológico de Coccidioidomicosis se basa generalmente en la detección por ID y fijación del complemento (CF) de anticuerpos a dos antígenos *Coccidioides*, IDTP y IDCF (24). Los anticuerpos IDTP se han asociado con la enfermedad primaria aguda y se cree que mayormente pertenecen a la clase IgM (24). Los anticuerpos IDCF persisten durante la fase crónica diseminada de la enfermedad y se han descrito principalmente como anticuerpos IgG (32). Sin embargo, los anticuerpos IDTP y IDCF podrían no detectarse en pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos (4,5,8). La prueba de CF, cuando se lleva a cabo conjuntamente con la prueba de ID, es la mejor combinación para hacer un presunto diagnóstico de Coccidioidomicosis (Tabla 1) (34). Los títulos de la prueba semicuantitativa de IDCF no son idénticos a los títulos de la prueba de CF, pero las tendencias son comparables y tienen un valor de pronóstico (24).

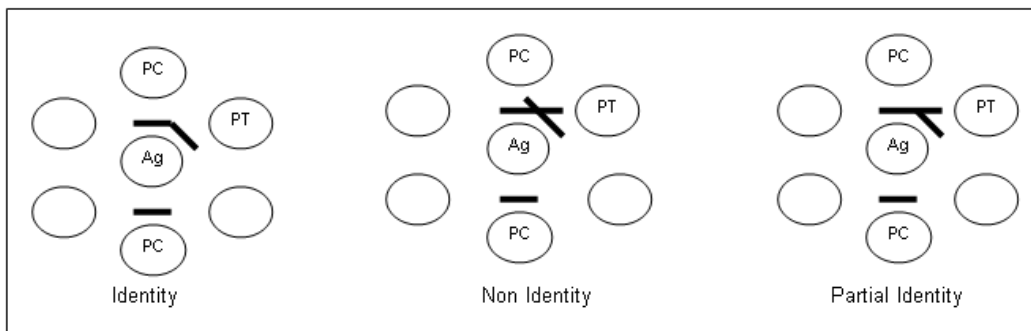
## HISTOPLASMOSIS:

La histoplasmosis surge de la infección por *H. capsulatum*, que tiene una distribución mundial pero es un problema particular de las áreas central y sudeste de los Estados Unidos y de ciertas regiones de América Central y del Sur (31). Se pueden detectar dos precipitinas en el suero de un paciente con histoplasmosis dirigido contra los antígenos "M" y "H". Los anticuerpos contra el antígeno "M" son los primeros en aparecer en la histoplasmosis pulmonar aguda (10) y forman la base de un inmunodiagnóstico específico, mientras que los anticuerpos del antígeno "H" aparecen después y con menos frecuencia (27), y su presencia suele estar relacionada con la diseminación extrapulmonar. Aproximadamente el 63 % de los casos de histoplasmosis confirmada por cultivo solo tienen una banda "M", en tanto que el 90 % tiene una sola banda "M" o bandas "H" y "M" en la prueba de ID (6). Las pruebas de ID y CF de histoplasmosis reaccionarán con un 85–94 % de suero de pacientes con histoplasmosis (6, 16). Los títulos de anticuerpos tienen valor de diagnóstico y pronóstico (26). El uso paralelo de las pruebas de ID y CF y los datos clínicos son un medio efectivo para el diagnóstico específico de histoplasmosis (Tabla 1) (34).

## PARACOCCIDIOIDOMICOSIS:

*P. brasiliensis* es el agente causal de la paracoccidioidomicosis, que es endémica en América Central y del Sur (9). La paracoccidioidomicosis en pacientes con SIDA es relativamente poco frecuente (12). Por lo tanto, la detección de anticuerpos es una herramienta útil de diagnóstico y pronóstico (9). La principal precipitina de diagnóstico es gp43 (también conocida como E2 o A), que se encuentra en el 95-98 % de los pacientes con paracoccidioidomicosis (9).

Figure 1.



PT= Patient

Ag= Antigen

## PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

La inmunodifusión es un ensayo cualitativo o semicuantitativo basado en los principios de doble difusión descritos por Oudin (22) y Ouchterlony (20,21). Un anticuerpo y su antígeno soluble homólogo se colocan en pocillos separados, cortados en un medio de difusión apropiado (agarosa o Cleargel™) y se los deja difundirse hacia el exterior, en el medio. Entre los dos pocillos, se establece una concentración de cada uno de los componentes de la reacción que se extiende desde el exceso de antígeno más cercano al pocillo de antígeno al exceso del anticuerpo más cercano al pocillo del anticuerpo. Se forma una línea visible de precipitado en el punto de equivalencia.

Se prueba la “identidad” de los anticuerpos al colocar suero del paciente adyacente a los pocillos de un sistema de referencia conocido. Además, se coloca la muestra del paciente adyacente a un control positivo para obtener un máximo de sensibilidad (p. ej., las muestras positivas bajas mostrarán una vuelta de la banda de referencia cuando se coloque adyacente a un control positivo). Si un complejo antígeno-anticuerpo es idéntico, una línea de precipitinas forma una línea continua de identidad con el sistema de referencia conocido. Los patrones de pocillos de la placa de inmunodifusión se disponen para proveer a la prueba de cada paciente un sistema de referencia conocido para que las reacciones de identidad resulten obvias a primera vista (Figura 1). También son posibles las reacciones de identidad parcial y sin identidad (Figura 1).

Una reacción de identidad parcial aparece cuando ciertos componentes de los anticuerpos son idénticos y otros no. Las reacciones de identidad parcial indican la apariencia simultánea de ambos, una reacción de identidad y una no reacción. El “acantocito” representa los componentes que no están relacionados. Se producirá una reacción de no identidad cuando los complejos antígeno-anticuerpo sean diferentes. La “X” o reacción cruzada resultante indica que existen dos complejos no relacionados.

## MATERIALES PROPORCIONADOS

¡Todos los reactivos son para uso diagnóstico *in vitro* únicamente! **Materiales suministrados** (dependen de qué kit o reactivos se compran)

### A. Antígenos de ID:

1. **Antígeno de ID de *Aspergillus*** (0,2 ml, REF A30000; 1,0 ml, REF A30110) Filtrados de cultivo de fase micelial combinado de *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, y *A. terreus*.
2. **Antígeno de ID de *A. fumigatus*** (1,0 ml, REF A70110) Filtrado de cultivo de fase micelial de *A. fumigatus*.
3. **Antígeno de ID de *A. flavus*** (1,0 ml, REF A90110) Filtrado de cultivo de fase micelial de *A. flavus*.
4. **Antígeno de ID de *A. niger*** (1,0 ml, REF AD0110) Filtrado de cultivo de fase micelial de *A. niger*.
5. **Antígeno de ID de *A. terreus*** (1,0 ml, REF AF0110) Filtrado de cultivo de fase micelial de *A. terreus*.
6. **Antígeno de ID de *Blastomyces*** (0,2 ml, REF B30000; 1,0 ml, REF B30110) Un extracto purificado del crecimiento de fase cepa de *B. dermatitidis* que contiene el antígeno “A”.

7. **Antígeno de ID de *Candida*** (0,25 ml, REF C50000; 1,0 ml, REF C50110) Filtrado de cultivo y preparación de lisado celular de crecimiento de fase cepa de *C. albicans* de serotipo A.
8. **Antígeno de IDCF de *Coccidioides*** (0,2 ml, REF C30000; 1,0 ml, REF C30110) Filtrado de cultivo de fase micelial de *C. immitis* que contiene el antígeno “IDCF”. Esta preparación también puede contener el antígeno “IDTP”.
9. **Antígeno de IDTP de *Coccidioides*** (1,0 ml, REF C70110) Filtrado de cultivo de fase micelial de *C. immitis* que contiene el antígeno “IDTP”.
10. **Antígeno de ID de *Histoplasma*** (0,2 ml, REF H50000; 1,0 ml, REF H50110) Filtrado de cultivo de fase micelial de *H. Capsulatum* que contiene los antígenos “H” y “M”.
11. **Antígeno de ID de *Paracoccidioides*** (1,0 ml, REF PI0110) Filtrado de cultivo de fase micelial de *P. brasiliensis* que contiene “gp43” y otros antígenos.

### B. Controles positivos de ID: (antisuero de cabra)

1. **Control positivo de ID de *Aspergillus*** (0,4 ml, REF A40000; 1,0 ml, REF A40110) Contiene anticuerpos dirigidos contra *A. fumigatus*, *A. Flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. Al menos dos bandas son evidentes contra el antígeno de ID de *Aspergillus* (REF A30000 y A30110).
2. **Control positivo de ID de *A. fumigatus*** (1,0 ml, REF A80110) Contiene anticuerpos dirigidos contra *A. fumigatus*. Al menos dos bandas son evidentes contra el antígeno de ID de *A. fumigatus* (REF A70110).
3. **Control positivo de ID de *A. flavus*** (1,0 ml, REF AA0110) Contiene anticuerpos dirigidos contra *A. flavus*. Al menos una banda es evidente contra el antígeno de ID de *A. flavus* (REF A90110).
4. **Control positivo de ID de *A. niger*** (1,0 ml, REF AE0110) Contiene anticuerpos dirigidos contra *A. niger*. Al menos una banda es evidente contra el antígeno de ID de *A. niger* (REF AD0110).
5. **Control positivo de ID de *A. terreus*** (1,0 ml, REF AG0110) Contiene anticuerpos dirigidos contra *A. terreus*. Al menos una banda es evidente contra el A. antígeno de ID de *A. terreus* (REF AF0110).
6. **Control positivo de ID de *Blastomyces*** (0,4 ml, REF B40000; 1,0 ml, REF B40110) Contiene anticuerpos dirigidos contra el antígeno “A” de *B. dermatitidis*. Una banda es evidente contra el antígeno de ID de *Blastomyces* (REF B30000 y B30110).
7. **Control positivo de ID de *Candida*** (0,5 ml, REF C60000; 1,0 ml, REF C60110) Contiene anticuerpos dirigidos contra el serotipo A de *C. albicans*. Al menos dos bandas son evidentes contra el antígeno ID de *Candida* (REF C50000 y C50110).
8. **Control positivo de IDCF de *Coccidioides*** (0,4 ml, REF C40000; 1,0 ml, REF C40110) Contiene anticuerpos dirigidos contra el antígeno ID de IDCF de *Coccidioides* (REF C30000 y C30110). La banda más cercana al pocillo del antígeno es IDCF. Si es evidente, la banda IDTP es la más cercana al pocillo de control positivo.
9. **Control positivo de IDTP de *Coccidioides*** (1,0 ml, REF CD0110) Contiene anticuerpos dirigidos contra el antígeno ID de IDTP de *Coccidioides* (REF C70110). Una banda es evidente contra el antígeno de IDTP de *Coccidioides*.

## MATERIALES NO PROPORCIONADOS

10. **Control positivo de ID de *Histoplasma*** (0,4 ml, REF H60000; 1,0 ml, REF H60110) Contiene anticuerpos dirigidos contra los antígenos "H" y "M" de *H. capsulatum*. Dos bandas son evidentes contra el antígeno de ID de *Histoplasma* (REF H50000 y H50110). La banda "H" está más cercana al pocillo de control positivo y la banda "M" está más cercana al pocillo del antígeno.
11. **Control positivo de ID de *Paracoccidioides*** (1,0 ml, REF PJ0110) Contiene anticuerpos dirigidos contra *P. brasiliensis* "gp43" y otros antígenos. Al menos una banda es evidente contra el antígeno de ID de *Paracoccidioides* (REF PI0110).

**Nota:** El tamaño de 0,2 ml del antígeno y los tamaños de 0,4 ml y 0,5 de los controles positivos están disponibles únicamente en kits y no pueden comprarse por separado.

### C. Placas de ID (Sin marcado CE. No disponible en la UE):

1. **Cleargel™ serie 1, 10/paq.** (REF CA1019)
2. **Cleargel™ series 4, 6/paq.** (REF ID1019)
3. **Cleargel™ serie 4, 6/paq. - Pocillo grande** (REF ID1039)
4. **Agarosa serie 4, 6/paq.** (REF ID1029)

(Las placas de ID se secan fácilmente. Guardar las bolsas bien cerradas. **NO CONGELAR.** Almacenar a 2-8° C.

**Nota:** Las placas Cleargel no se usan con antisuero de conejo.

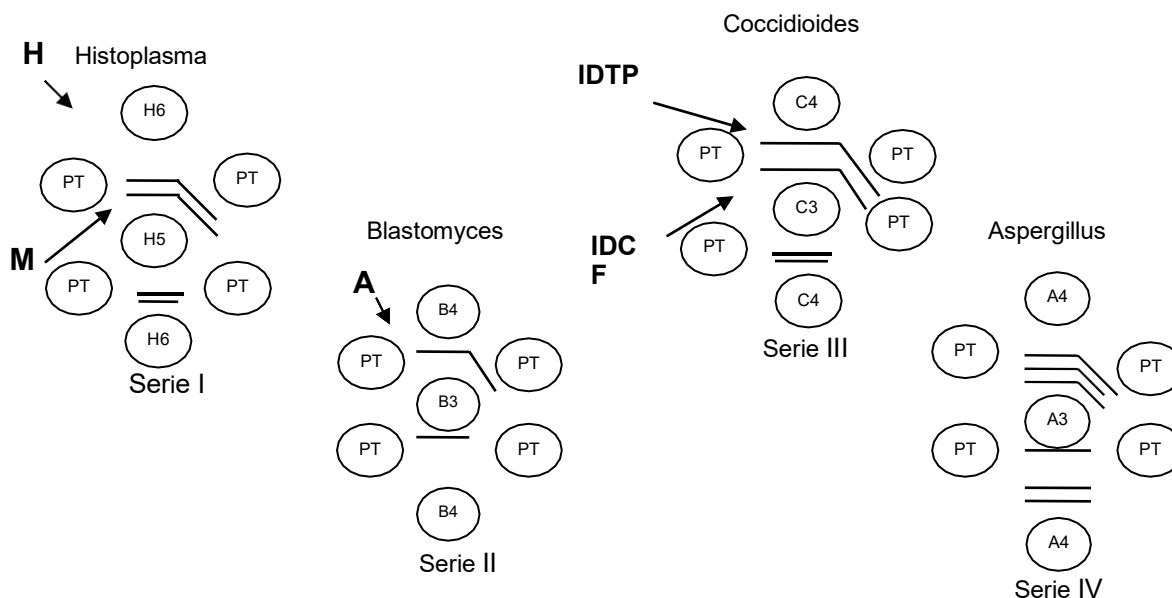
- D. **Formularios de placas:** formularios de placas para anotar los datos del paciente y los resultados de las pruebas.

1. Agua destilada o DI.
2. Cámara húmeda: puede utilizarse cualquier envase adecuado que tenga una cierre hermético (p. ej., placa de Petri, caja de plástico, frasco grande con tapa a rosca). También debe contener un papel de filtro de humedad o papel absorbente, siempre que las placas de ID permanezcan estacionarias, niveladas e hidratadas durante la incubación.
3. Luz de lectura: se utiliza una luz de alta intensidad (VWR Cat. n.º 41447-193 o similar) para leer las reacciones de ID.
4. Pipeta y boquillas: se necesitan una pipeta y boquillas capaces de medir 20-35 µl para llenar los pocillos de las placas de ID.
5. Se pueden utilizar solución salina amortiguadora de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) o solución salina normal para la dilución de los muestras del paciente para la prueba semicuantitativa de ID.

## ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los antígenos fúngicos deberían almacenarse a 2-8 °C y permanecer estables hasta la fecha de vencimiento. El suero de control positivo es estable hasta la fecha de vencimiento cuando se almacena a 2-8 °C **ANTES DE** la rehidratación. El control positivo rehidratado permanecerá estable por un mes si se almacena a 2-8 °C. Para los períodos de almacenamiento más extensos que un mes, el suero de control positivo rehidratado debería subdividirse y congelarse donde permanecerá estable hasta la fecha de vencimiento. Se deben evitar los congelamientos y descongelamientos repetidos. Cuando se usen sueros de control positivo, el tiempo a temperatura ambiente debería ser lo más corto posible. Las placas de ID permanecen estables hasta su fecha de vencimiento siempre que se almacenen a 2-8 °C en su bolsa con cierre hermético para evitar que se sequen (indicado por un incremento de la opacidad). Las placas de ID **NUNCA** deben congelarse.

Figura 2.



## PRECAUCIONES

Todos los reactivos fúngicos de ID son para uso diagnóstico *in vitro* únicamente. Es necesaria una estandarización específica para producir nuestros reactivos y materiales de alta calidad. IMMY no puede garantizar la eficacia de sus productos cuando se utilicen con otros materiales que se hayan comprado a otros fabricantes. El usuario asume plena responsabilidad respecto de toda modificación de los procesos aquí publicados. Cuando se manipulen muestras de pacientes, se deben tomar las medidas adecuadas para evitar la exposición de los agentes etiológicos potencialmente presentes en las muestras. Los sueros de control positivo se conservan con 0,095 % p/p de azida de sodio. Por tanto, se recomienda que el exceso de control positivo simplemente se deseché en un receptáculo adecuado de desperdicio.

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO

**Rehidratación de controles positivos:** para un tamaño de 0,4 ml de control positivo, agregar 0,4 ml de agua destilada o DI; para un tamaño de 0,5 ml agregar 0,5 ml; para tamaños de 1 ml agregar 1 ml. Incubar a temperatura ambiente hasta que esté completamente disuelto, luego mezclar despacio.

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para resultados óptimos, se usa suero esterilizado que no debería ser severamente lipémico ni estar contaminado. Si se retrasa el procesamiento de la muestra, se permite el almacenamiento a 2-8°C durante hasta 72 horas. Las muestras pueden almacenarse por periodos más extensos a <-20° C, siempre y cuando no se congelen y descongelen repetidamente. Las muestras en tránsito entre los laboratorios deberían mantenerse a 2-8 °C para obtener resultados óptimos. Las muestras pueden conservarse con 0,01 % de timerosal o 0,095 % de azida de sodio si es necesario.

## PROCEDIMIENTO

### Procedimiento del sistema de anticuerpos fúngicos de ID (REF ID1001)

1. Etiquetar las placas de ID que se utilizarán con un número de identificación y la fecha. Colocar las placas en un fondo oscuro para el llenado de los pocillos.
2. Llenar los pocillos de control positivo (consulte la Figura 2) de las placas de ID con los sueros de control positivo adecuados de la siguiente manera:
  - A. Control positivo de ID de *Histoplasma*: Serie I, pocillos 1 y 4. (H6)
  - B. Control positivo de ID de *Blastomyces*: Serie II, pocillos 1 y 4. (B4)
  - C. Control positivo de ID de *Coccidioides*: Serie III, pocillos 1 y 4. (C4)
  - D. Control positivo de ID de *Aspergillus*: Serie IV, pocillos 1 y 4. (A4)

**NOTA:** Para llenar los pocillos adecuadamente, llenar el pocillo hasta que su borde desaparezca. Prestar especial atención de llenar los pocillos con la cantidad adecuada.

3. Anotar el número de la placa, el número de lote y la fecha para la placa en el formulario de la placa.
4. Anotar el nombre, la fecha o el número de laboratorio del primer paciente en la línea 2 de la columna de la izquierda en el formulario de la placa.
5. Llenar el pocillo 2 de las Series I, II, III y IV de la placa con la muestra del primer paciente.

6. Repetir los pasos 4 y 5 con cada muestra de un paciente adicional usando los pocillos 3, 5 y 6 de las Series I, II, III y IV.
7. Después de agregar el control positivo y los sueros de paciente, la placa cerrada puede preincubarse a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esto hará que las bandas sean levemente más intensas que si los antígenos se agregaran de inmediato.
8. Llenar el centro del pocillo (n.º 7) de la Serie I con el antígeno de ID de *Histoplasma* (H5). Repetir el proceso de llenado de los pocillos centrales con el antígeno de ID de *Blastomyces* (B3) (Serie II), el antígeno de ID de *Coccidioides* (C3) (Serie III) y el antígeno de ID de *Aspergillus* (A3) (Serie IV).
9. Colocar las placas de ID cerradas a nivel en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente durante 24 horas.
10. Después de 24 horas, leer y anotar las bandas de ID en el formulario de análisis. Consulte **Lectura de la prueba**. En este punto debería elaborarse un informe provisional si no se observa ninguna reacción de identidad o de identidad parcial. Los resultados positivos deberían informarse de inmediato. Si las bandas de control no aparecieran en 24 horas, entonces repetir la prueba.
11. Se recomiendan 24 horas **adicionales** para confirmar un resultado negativo. Se elabora un informe final al concluir este período. (Algunas reacciones de pacientes con antígenos de ID de *Histoplasma* y *Blastomyces* podrían no aparecer hasta las 48 horas de incubación).

### **Especies de *Aspergillus*, sistema de anticuerpos de ID de *Candida* (REF CA1001), procedimiento de inmunodifusión de *Paracoccidioides*, reactivos individuales y placas individuales**

1. Etiquetar las placas de ID que se utilizarán con un número de identificación y la fecha. Colocar las placas en un fondo oscuro para el llenado de los pocillos.
2. Utilizar el control positivo de ID adecuado, llenar los pocillos 1 y 4 de las placas de ID con el control positivo de ID.

**NOTA:** Para llenar los pocillos adecuadamente, llenar el pocillo hasta que su borde desaparezca. Prestar especial atención de utilizar la cantidad adecuada para llenar los pocillos.

3. Anotar el número de la placa, el número de lote y la fecha para la placa en el formulario de la placa.
4. Anotar el nombre, la fecha o el número de laboratorio del primer paciente en la línea 2 de la columna de la izquierda en el formulario de la placa.
5. Llenar el pocillo 2 de la placa de ID con la muestra del primer paciente.
6. Repetir los pasos 4 y 5 con cada muestra de un paciente adicional usando los pocillos 3, 5 y 6.
7. Después de agregar el control positivo y los sueros de paciente, la placa cerrada puede preincubarse a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esto hará que las bandas sean levemente más intensas que si los antígenos se agregaran de inmediato.
8. Llenar el centro del pocillo (n.º 7) con el antígeno de ID homólogo.
9. Colocar las placas de ID cerradas a nivel en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente durante 24 horas.
10. Después de 24 horas, leer y anotar las bandas de ID en el formulario de análisis. Consulte **Lectura de la prueba**. En este punto debería elaborarse un informe provisional si no se observa ninguna reacción de

11. identidad o de identidad parcial. Los resultados positivos deberían informarse de inmediato. Si las bandas de control no aparecieran en 24 horas, entonces repetir la prueba.
12. Se recomiendan 24 horas **adicionales** para confirmar un resultado negativo. Se elabora un informe final al concluir este período.

### **Procedimiento semicuantitativo de ID:**

1. Etiquetar las placas de ID que se utilizarán con un número de identificación y la fecha. Colocar las placas en un fondo oscuro para el llenado de los pocillos.
2. Utilizar el control positivo de ID adecuado, llenar los pocillos 1 y 4 de las placas de ID.

**NOTA:** Para llenar los pocillos adecuadamente, llenar el pocillo hasta que su borde desaparezca. Prestar especial atención de utilizar la cantidad adecuada para llenar los pocillos.

3. Anotar el número de la placa y la fecha para la placa en el formulario de la placa.
4. Anotar el nombre, la fecha o el número de laboratorio del primer paciente en la línea 2 de la columna de la izquierda en el formulario de la placa.
5. Llenar el pocillo 2 de la placa de ID con la muestra del primer paciente sin diluir.
6. Repetir los pasos 4 y 5 con cada dilución de una muestra de un paciente adicional usando los pocillos 3, 5 y 6. Pueden realizarse diluciones dobles en serie de la muestra del paciente con PBS o solución salina normal.
7. Después de agregar el control positivo y los sueros de paciente, la placa cerrada puede incubarse a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esto hará que las bandas sean levemente más intensas que si los antígenos se agregaran de inmediato.
8. Llenar el centro del pocillo (n.º 7) con el antígeno de ID homólogo.
9. Colocar las placas de ID cerradas a nivel en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente durante 24 horas.
10. Después de 24 horas, leer y anotar las bandas de ID en el formulario de análisis. Consulte **Lectura de la prueba**. En este punto debería elaborarse un informe provisional si no se observa ninguna reacción de identidad o de identidad parcial. Los resultados positivos deberían informarse de inmediato. Si las bandas de control no aparecieran en 24 horas, entonces repetir la prueba.
11. Se recomiendan 24 horas **adicionales** para confirmar un resultado negativo. Se elabora un informe final al concluir este período.

### **Lectura de la prueba**

Las bandas de precipitinas en la placa de ID pueden leerse fácilmente con la ayuda de un haz de luz de alta intensidad si la placa se coloca en un fondo oscuro. La luz se proyectará entonces a través de la placa por debajo de aproximadamente 45° de la superficie de la placa. El ojo de la persona que lee la prueba debe estar por encima de la placa, fuera del haz de luz, en una posición tal que la luz se refleje sobre las bandas y las haga aparecer brillantes. La rotación de las placas de ID puede ayudar a identificar las reacciones débiles positivas de ID. Anotar en el formulario de lectura todas las bandas observadas en las placas.

Las bandas de control, como se describió previamente en la sección B "Controles positivos de ID", deben estar presentes para que las pruebas del paciente sean válidas. Si alguna banda no estuviera presente, la prueba se debe repetir. Se debe prestar especial atención a la orientación de las bandas producidas por el suero del paciente en relación con las bandas de control. Los extremos de las bandas deben observarse cuidadosamente. Una unión lisa de las bandas es indicativa de una reacción de identidad y una unión con un acantocito es indicativa de una reacción de identidad parcial (Figura 1). Si se observa que el control se inclina hacia una posición delante del pocillo del paciente, es indicativo de un anticuerpo del paciente de título débil. Se recomienda disponer las muestras positivas débiles con el control positivo en el pocillo 1, la muestra del paciente en el pocillo 2, el control negativo (Cat n.º N80110) o una muestra negativa en el pocillo 6, y el antígeno en el pocillo 7. Esta disposición ayudará a confirmar un resultado positivo débil. Las bandas de identidad parciales contienen a la vez una banda de identidad y una banda de no reacción y, por lo tanto, se consideran positivas debido a la banda de identidad.

Deben probarse las bandas de no identidad contra el antígeno de ID de *Aspergillus* para determinar si son o no debido a la proteína 'C' reactiva. Esta reacción falso positiva puede eliminarse al sumergir la placa en citrato de sodio al 5 % durante aproximadamente 45 minutos a temperatura ambiente seguido de un enjuague con agua DI y la reaplicación de citrato de sodio al 5 % durante 45 minutos adicionales antes de leer la reacción.

### **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Las bandas de identidad o de identidad parcial con un control positivo se consideran positivas e indican un anticuerpo del paciente contra el antígeno en cuestión. La ausencia de bandas o las reacciones de no identidad se consideran como prueba negativa (1-3); sin embargo, las reacciones de no identidad con *Aspergillus* o *Candida* harían sospechar Aspergilosis o Candidiasis. Si bien no se puede realizar un diagnóstico específico en ausencia de reacciones de identidad o de identidad parcial, debe informarse el número de bandas.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La mayor limitación del procedimiento de prueba se constata con las muestras de pacientes que tengan principios de infecciones primarias (primeras 3-6 semanas). Además, los pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos pueden no producir cantidades detectables de anticuerpos.

## VALORES ESPERADOS Y CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

### ASPERGILOSIS:

Se pueden encontrar precipitinas en el >90 % de los pacientes con aspergilomas y en el 70 % de los pacientes con ABPA (26). El mayor número de casos de Aspergilosis puede detectarse con el uso de antígenos de *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, y *A. terreus* en pruebas de ID separadas, realizadas al mismo tiempo (26). Las precipitinas son menos frecuentes en pacientes con Aspergilosis invasiva. Ciertos extractos antigénicos de *Aspergillus* spp. contienen substancia C que puede reaccionar con la proteína C reactiva en el suero de algunos pacientes con enfermedad inflamatoria. El complejo resultante forma un precipitado que podría malinterpretarse como anticuerpos de *Aspergillus* (26). De hecho, es más probable que la presencia del anticuerpo anti-*Aspergillus* en personas inmunocomprometidas represente un anticuerpo formado antes del comienzo de la terapia inmunosuprimida más que como resultado de una infección invasiva. Un aumento en el título del anticuerpo al final de la inmunosupresión es indicativo de recuperación de IA, mientras que la ausencia de un título del anticuerpo o la disminución de los niveles de anticuerpos sugiere un mal pronóstico. Así, la detección de anticuerpos puede usarse como pronóstico pero no como diagnóstico para IA (19). Deberían formarse dos o más líneas distintas de precipitina cuando

A. el antisuero de referencia de *A. fumigatus* pueda reaccionar con el antígeno de *A. fumigatus*. Deberían formarse dos o más líneas distintas de precipitina cuando el antisuero de referencia de *A. flavus*, *A. niger* o *A. terreus* pueda reaccionar con el antígeno homólogo. Debido a que no se han definido los antígenos de *Aspergillus* de importancia diagnóstica, cualquier banda de precipitina (que sea de identidad, de identidad parcial o no identidad) es significativa y debería anotarse el número de bandas. La demostración de una o más precipitinas indica infección, incluida aspergiloma. Los anticuerpos precipitantes son a menudo detectables en el suero de pacientes con ABPA. Aunque pueden aparecer una o dos precipitinas con cualquier forma clínica de Aspergilosis, la presencia de tres o más bandas está invariablemente asociada con aspergiloma o IA. La prueba puede ser negativa para algunos pacientes bajo tratamiento antifúngico o con corticoesteroides a largo plazo. Cuando se usa con antisueros de referencia la prueba de ID es específica al 100 % (26).

### BLASTOMICOSIS:

La prueba de ID para Blastomicosis es positiva en aproximadamente el 80 % de los casos confirmados en cultivo (18). Una prueba negativa tiene poco valor y no excluye en ningún caso la existencia de Blastomicosis activa. Una prueba positiva proporciona evidencia comprobable de una infección activa o reciente. Los sueros de pacientes que tengan otras infecciones micóticas (Histoplasmosis y Coccidioidomicosis) pueden producir bandas contra el antígeno *Blastomyces*; sin embargo, estas bandas no forman reacciones de identidad con la banda "A" producida por el control positivo de *Blastomyces* (3). La detección de anticuerpos es útil para probar y controlar a los pacientes que tengan una sospecha de meningitis blastomycótica y para evaluar la respuesta al tratamiento antifúngico. La prueba de ID para Blastomicosis con antígeno "A" de *B. dermatitidis* es específica. Las reacciones positivas pueden ser la base de un tratamiento inmediato del paciente sin la necesidad de pruebas paralelas con los antígenos de *Coccidioides* e *Histoplasma* (26). Sin embargo, las pruebas negativas no excluyen un diagnóstico de Blastomicosis. Solo las pruebas que producen líneas de identidad o de identidad parcial con el antígeno "A" se consideran positivas para Blastomicosis. La prueba de ID permitió el serodiagnóstico del 79 % de 113 casos confirmados de Blastomicosis (26). Sin embargo, no es fácil determinar si los sueros de ciertos pacientes con Blastomicosis son positivos con la prueba de ID. Los pacientes con reacciones negativas de suero deben estudiarse exhaustivamente (en cultivo o histológicamente) con el fin de encontrar pruebas de Blastomicosis. Además, algunas muestras de suero deben obtenerse a intervalos de 3 semanas y debe examinarse el desarrollo de bandas de precipitina de antígeno "A" (26). En los pacientes que presentan casos establecidos de Blastomicosis, la desaparición de la banda de precipitina del antígeno "A" es una prueba de un pronóstico favorable (26). Sin embargo, la reactividad serológica no cambia tan rápidamente como la respuesta clínica (26).

### CANDIDIASIS:

La prueba de ID para la detección de anticuerpos de las especies *Candida* es apropiada para los sueros de los pacientes con candidemia, neumonitis, endocarditis, heridas o abscesos intraabdominales y catéteres intravasculares o urinarios permanentes (26). Los pacientes debilitados y aquellos que reciben agentes inmunosupresores y antibióticos por un periodo prolongado tienen un riesgo alto de padecer candidiasis invasiva (26). Cuando se tornan granulocitopénicos y desarrollan una fiebre inexplicable, deben analizarse para detectar anticuerpos de la especie *Candida* (26). La detección de precipitinas se considera evidencia probable de candidiasis sistémica, pero también pueden indicar colonización o una candidemia transitoria (26). La prueba de ID para los anticuerpos tiene una sensibilidad de alrededor del 80 % en lo que concierne a la confirmación de candidiasis invasiva en huéspedes inmunológicamente intactos (26). Debido a que no se han definido los antígenos de *Candida* de importancia diagnóstica, toda banda de precipitina (que tuviera identidad, identidad parcial o sin identidad) es significativa y el número de bandas debe anotarse. El control positivo de ID de *Candida* debe contener al menos dos precipitinas. La producción de una o más precipitinas constituye una reacción positiva. Debe sospecharse firmemente candidiasis sistémica cuando una serie de muestras manifiesten una seroconversión (es decir, cuando los resultados negativos de las pruebas de anticuerpos se tornen positivos) o muestren aumentos en el número de precipitinas (26).



## COCCIDIOIDOMICOSIS:

La formación de una banda de "IDCF" y ocasionalmente de una banda de "IDTP" entre una muestra de paciente y el antígeno de *Coccidioides* es evidencia probable de infección actual y reciente por *C. immitis*. Ciertas personas continúan produciendo anticuerpos detectables durante un periodo significativo (hasta 1 año) después de la recuperación clínica de una enfermedad activa (14). Una prueba negativa no excluye la Coccidioidomycosis (3, 14, 17, 23, 28, 29). Pueden constatarse reacciones cruzadas en los pacientes que tengan otros hongos sistémicos (particularmente *H. capsulatum*), por lo que se debe tener cuidado cuando se lean las reacciones de identidad (3,17,29). Las pruebas de fijación de látex y complementos pueden proporcionar información complementaria en lo que concierne al estado del paciente (14). Las precipitinas del suero pueden detectarse de 1 a 3 semanas después del inicio de la infección primaria en un amplio porcentaje de pacientes, incluso antes de que los resultados de la prueba de fijación de complementos se tornen positivos. En alrededor de un 80 % de todas las infecciones, se observa una precipitina de "IDTP" en las 2 semanas desde el inicio de los síntomas, y rara vez se detecta 6 meses después de la infección (26). Se han encontrado reacciones de IDTP falso positivas con las muestras de pacientes con fibrosis quística (26). La prueba de IDCF es extremadamente específica. La prueba semicuantitativa de IDCF da resultados comparables con aquellos obtenidos por la prueba de CF (24). El título semicuantitativo de IDCF no es idéntico a la prueba de CF, pero las tendencias son comparables (24). La prueba semicuantitativa de IDCF en muestras seriales puede mostrar diferencias en los patrones de intensidad y bandas, lo que tiene un valor de pronóstico (24,26).

## HISTOPLASMOSIS:

La evidencia serológica es a menudo el primer factor en un diagnóstico definitivo de Histoplasmosis. Los antígenos clínicamente significativos de *H. capsulatum* son antígenos "H" y "M" designados. (Nota: La banda "H" es la más cercana al pocillo de control positivo, mientras que la banda "M" es la más cercana al pocillo del antígeno). Las precipitinas contra el antígeno "M" son las primeras en aparecer en el caso de Histoplasmosis pulmonar aguda y forman la base de un inmunodiagnóstico específico. Las precipitinas "H" se producen más tarde y menos frecuentemente y su presencia está vinculada con mayor frecuencia a una diseminación extrapulmonar. Se ha detectado la banda "M" en alrededor del 63 % de los pacientes con un cultivo confirmado de Histoplasmosis, mientras que la banda "H" aparece solamente en el 27 % de los casos (6). La banda "H" rara vez se observa en la ausencia de anticuerpos contra el antígeno "M". La banda "M" puede aparecer en pacientes que se hayan recuperado recientemente de una Histoplasmosis, así como en el suero de anteriores con Histoplasmosis previa que hayan tenido recientemente una prueba de piel positiva (15). Dado que la prueba puede ser negativa en hasta el 10 % de los casos demostrados en cultivos, la ausencia de una banda "H" o "M" no excluye la Histoplasmosis (6,13,15). La combinación de las pruebas de ID y CF reaccionarán con un 85-94 % del suero de pacientes con Histoplasmosis (6, 16). La presencia solo de anticuerpos "M" en el suero puede atribuirse a una enfermedad activa, una enfermedad inactiva o a una prueba de piel en los huéspedes previamente sensibilizados. El suero del 70 % de los pacientes con Histoplasmosis confirmada contiene precipitinas "M", mientras que solo el 10 % de los sueros manifiestan a la vez precipitinas "M" y "H" (6). La manifestación simultánea de bandas "M" y "H"

sugiere fuertemente una Histoplasmosis activa, sin perjuicio de otros resultados serológicos. La detección de precipitinas "M" y "H" en muestras de CSF indica una Histoplasmosis meningocócica (26).

## PARACOCCIDIOIDOMICOSIS:

La prueba de ID usando los antígenos *P. brasiliensis* tiene una sensibilidad del 94 % con sueros provenientes de pacientes con Paracoccidioidomycosis (26). La principal línea de precipitación en la prueba de ID muestra la identidad con gp43 (25). Se observan hasta tres precipitinas en los sueros de pacientes con Paracoccidioidomycosis. Una precipitina mayor, la gp43, es la más cercana al pocillo del antígeno y es serológicamente idéntica a las líneas de precipitinas "E2" o "A" designadas originalmente. La precipitina reactiva con la gp43 se encuentra en el 95-98 % de los pacientes con casos activos seropositivos de Paracoccidioidomycosis (26). La precipitina gp43 es la más prevalente y es más duradera que las otras dos principales precipitinas de suero; estas últimas desaparecen primero en los pacientes que responden favorablemente al tratamiento (26). El valor predictivo de un resultado de ID positivo es de 100 % ya sea en el momento del diagnóstico, o bien en periodos variables durante y después de la terapia, en comparación con los resultados de controles sanos, pacientes tuberculosos o aquellos con otras micosis (26).

## REFERENCIAS

1. 1977. Immunodiffusion Test for Candididiasis, p. 44-52. In D. Palmer, L. Kaufman, W. Kaplan y J. Cavallaro (eds.), Serodiagnosis of Mycotic Diseases. C C Thomas Publishing, Springfield.
2. 1977. Immunodiffusion Tests for Aspergillosis, p. 111-122. En D. Palmer, L. Kaufman, W. Kaplan y J. Cavallaro (eds.), Serodiagnosis of Mycotic Diseases. C C Thomas Publishing, Springfield.
3. 1977. Microimmunodiffusion Test for Coccidioidomycosis, Blastomycosis, and Histoplasmosis, p. 7-18. En D. Palmer, L. Kaufman, W. Kaplan y J. Cavallaro (eds.), Serodiagnosis of Mycotic Diseases. C C Thomas Publisher, Springfield.
4. Abrams, D. I., M. Robia, W. Blumenfeld, J. Simonson, M. B. Cohen y W. K. Hadley. 1984. Disseminated coccidioidomycosis in AIDS. N.Engl.J.Med. 310:986-987.
5. Antoniskis, D., R. A. Larsen, B. Akil, M. U. Rarick y J. M. Leedom. 1990. Seronegative disseminated coccidioidomycosis in patients with HIV infection. AIDS 4:691-693.
6. Bauman, D. S. y C. D. Smith. 1976. Comparison of immunodiffusion and complement fixation tests in the diagnosis of histoplasmosis. J.Clin.Microbiol. 2:77-80.
7. Bradsher, R. W. y P. G. Pappas. 1995. Detection of specific antibodies in human blastomycosis by enzyme immunoassay. South.Med.J. 88:1256-1259.
8. Bronnimann, D. A., R. D. Adam, J. N. Galgiani, M. P. Habib, E. A. Petersen, B. Porter y J. W. Bloom. 1987. Coccidioidomycosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann.Intern.Med. 106:372-379.
9. Brummer, E., E. Castaneda y A. Restrepo. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin.Microbiol.Rev. 6:89-117.
10. Bullock, W. E. 1995. *Histoplasma capsulatum*, p. 2340-2353. En G. L. Mandell, J. Bennet y R. Dolin (eds.), Principles and practice of infectious disease. Churchill Livingstone, Nueva York.
11. Fisher, M. C., B. Rannala, V. Chaturvedi y J. W. Taylor. 2002. Disease surveillance in recombining pathogens: multilocus genotypes identify sources of human *Coccidioides* infections. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99:9067-9071.
12. Goldani, L. Z. y A. M. Sugar. 1995. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. Clin.Infect.Dis. 21:1275-1281.
13. Helner, D. 1958. Diagnosis of Histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. Pediatrics 22:616-627.
14. Huppert, M. y J. W. Bailey. 1965. The use of immunodiffusion tests in coccidioidomycosis. Amer.J.Clin.Path. 44:364-368.

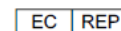


15. Kaufman, L. 1973. Value of immunodiffusion tests in the diagnosis of systemic mycotic diseases. *Ann.Clin.Lab.Sci.* 3:141-146.
16. Kaufman, L. 1992. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. *Clin.Infect.Dis.* 14 Suppl 1:S23-S29.
17. Kaufman, L. y M. J. Clark. 1974. Value of the concomitant use of complement fixation and immunodiffusion tests in the diagnosis of coccidioidomycosis. *Appl.Microbiol.* 28:641-643.
18. Kaufman, L., J. A. Kovae y E. Reiss. 1997. Clinical immunomycology, p. 575-583. *En* N. Rose, E. de Macario, J. Folds, H. Lane y R. Nakamura (eds.), *Manual of clinical laboratory immunology.* American Society for Microbiology, Washington, DC.
19. Latge, J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin.Microbiol.Rev.* 12:310-350.
20. Ouchterlony, O. 1949. Antigen-Antibody reactions in gels and the practical application of this phenomenon in the laboratory diagnosis of diphtheria, Stockholm.
21. Ouchterlony, O. 1968. *Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis.* Ann Arbor Publishers, Inc., Ann Arbor.
22. Oudin, J. 1948. L'analyse, immunochimique qualitative. Methode par diffusion des antigenes au sein de l'immunserum precipitatnt gelose. *Premiere Parte.AnnInst.Pasteur* 75:30-52.
23. Palmer, D., L. Kaufman, W. Kaplan y J. Cavallaro. 1977. *Serodiagnosis of Mycotic Diseases.* Charles C Thomas, Springfield, IL.
24. Pappagianis, D. y B. L. Zimmer. 1990. Serology of coccidioidomycosis. *Clin.Microbiol.Rev.* 3:247-268.
25. Puccia, R., S. Schenkman, P. A. Gorin y L. R. Travassos. 1986. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect.Immun.* 53:199-206.
26. Reiss, E., L. Kaufman, J. Kovacs y M. Lindsley. 2002. Clinical Immunomycology, p. 559-583. *En* N. Rose, R. Hamilton, y B. Detrick (eds.), *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* ASM Press, Washington, DC.
27. Reiss, E., J. B. Knowles, S. L. Bragg y L. Kaufman. 1986. Monoclonal antibodies against the M-protein and carbohydrate antigens of histoplasmin characterized by the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Infect.Immun.* 53:540-546.
28. Smith, C. 1943. Coccidioidomycosis. *Med.Clin.North Amer.* 27:790-807.
29. Smith, C., M. Salito, R. Beard, R. Kepp, K. Kepp, R. Clark y B. Eddie. 1950. Serologic tests in the diagnosis and prognosis of coccidioidomycosis. *Amer.J.Hyg.* 52:1-2.
30. Stallybrass, F. C. 1964. *Candida* precipitins. *J.Pathol.Bacteriol.* 87:89-97.
31. Wheat, J. 1995. Endemic mycoses in AIDS: a clinical review. *Clin.Microbiol.Rev.* 8:146-159.
32. Zimmermann, C. R., S. M. Johnson, G. W. Martens, A. G. White, B. L. Zimmer y D. Pappagianis. 1998. Protection against lethal murine coccidioidomycosis by a soluble vaccine from spherules. *Infect.Immun.* 66:2342-2345.
33. Kaufman, L. y E. Reiss. 1986. Serodiagnosis of Fungal Diseases, p.446-466. *En* N. Rose, H. Friedman y J.L. Fahey (eds.), *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* American Society for Microbiology, Washington, DC.
34. 1977. The Complement Fixation Test, p. 155-181. *En* D. Palmer, L. Kaufman, W. Kaplan y J. Cavallaro (eds.), *Serodiagnosis of Mycotic Diseases.* C.C. Thomas Publisher, Springfield.

International Symbol Usage

	Storage 2-8 °C		Lot Number
	Manufactured by		Catalog Number
	Expiration Date		In Vitro Diagnostics
	CE Symbol		Sufficient for "Σ" Tests

 IMMY, Inc.  
 2701 Corporate Centre Dr.  
 Norman, OK 73069  
 EE. UU.  
 (405) 360-4669 o (800) 654-3639  
 Fax: (405) 364-1058  
 Correo electrónico:  
[info@immy.com](mailto:info@immy.com)  
 WEB: [www.immy.com](http://www.immy.com)



MDSS  
 Schiffgraben 41  
 30175 Hannover, Germany