

# SENSIBILIDAD DERMICA A DIFERENTES DOSIS DE ESFERULINA Y COCCIDIOIDINA <sup>1</sup>

Dres. David A. Stevens,<sup>2</sup> H. B. Levine<sup>3</sup> y David R. Ten Eyck<sup>4</sup>

*Este estudio revela la mayor eficacia de la esferulina, comparada con la coccidioidina, en la detección de la sensibilidad al C. immitis con fines epidemiológicos.*

La coccidioidina (1, 2) ha desempeñado una función importante en la detección de experiencias humanas con el *Coccidioides immitis* mediante la reacción intradérmica de sensibilidad retardada. El reactivo es un lisado de la forma micelial del hongo. Sin embargo, el micelio raramente se observa en las lesiones; el hongo es dimórfico y la forma que predomina *in vivo* es el esporangio o la esférula (3). Los lisados de la fase de esférula (4) (esferulinas) también indujeron (5, 6) la hipersensibilidad retardada y, en animales, resultan más sensibles que la coccidioidina para detectar las infecciones por *C. immitis*.

Un estudio anterior (7), realizado en México, amplió los resultados al comparar la dosis normal de coccidioidina (1:100) con la esferulina (2.8 µg) en el hombre. Entre los residentes de zonas endémicas para la coccidioidomicosis, la esferulina detectó un 33% más de sujetos positivos que la coccidioidina. Ninguno de los reactivos provocó reacciones entre sujetos control que no habían entrado en la zona endémica. Tampoco se observaron reacciones cruzadas debidas a *Histoplasma capsulatum*, si bien este hongo y el *C. immitis* tienen antígenos comunes (2).

En el presente trabajo se compararon ambos reactivos en sujetos residentes en el Valle de San Joaquín, California. Se utilizó la dosis mencionada así como dosis 10 veces más concentradas. El informe describe los hallazgos y las reacciones de los sujetos seleccionados a la histoplasmina.

## Materiales y métodos

**Reactivos.** Se preparó esferulina de *C. immitis*, cepa 46 (6), de conformidad con los métodos anteriormente publicados (5). Se empleó el lote 64D4 de coccidioidina, gentilmente proporcionado por el Dr. Demosthenes Pappagianis, de la Escuela de Medicina de la Universidad de California, Davis. Esta coccidioidina procedía del lote de referencia nacional. Fueron ensayadas dos diluciones de cada reactivo: de 1:100 y 1:10 de coccidioidina (que corresponden aproximadamente a 26 µg y 260 µg, peso seco) y 2.8 y 28 µg (peso seco) de esferulina. Para determinar la posible reactividad cruzada se empleó histoplasmina (Parke, Davis & Co., Detroit) en individuos seleccionados.

**Sujetos.** La población de estudio estaba integrada por 298 voluntarios, residentes de Livingston, California, o sus cercanías, la cual es zona endémica para el *C. immitis*. El 79% de estos individuos, o sea 236, eran adultos sanos que trabajaban en una fábrica local y cuya edad oscilaba entre 18 y 61 años. También se estudiaron 62 residentes que respondieron al llamado de cooperación voluntaria, en un centro de salud de la

<sup>1</sup> Este estudio contó con el apoyo del Departamento de Promoción y Coordinación de Investigaciones de la Organización Panamericana de la Salud.

Publicado en inglés en *Chest* 65(5):530-533, 1974.

<sup>2</sup> División de Enfermedades Infecciosas, Departamentos de Medicina del Centro Médico del Valle de Santa Clara y de la Universidad de Stanford (San José y Stanford), California.

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología Médica, Laboratorio Naval de Investigaciones Biomédicas, Escuela de Salud Pública, Universidad de California, Berkeley, California.

<sup>4</sup> Unidad Naval de Investigaciones Médicas de los E.U.A., Universidad de California, Berkeley, California.

comunidad. La edad de estos individuos oscilaba entre 8 y 87 años. Todos los sujetos otorgaron su consentimiento por escrito.

*Plan de estudio.* Todos los voluntarios recibieron 0.1 ml de coccidioidina (1:100) en la superficie del músculo flexor del antebrazo izquierdo y esferulina (2.8  $\mu\text{g}$ ) en el derecho. Las reacciones fueron leídas a las 24 y a las 48 horas y expresadas como la media de los ejes más largo y más corto del área indurada. Solo se aceptaron como positivas las induraciones de 5 x 5 mm o mayores. Los sujetos que a las 24 y a las 48 horas presentaban reacciones negativas, volvían a someterse a la prueba con diluciones 10 veces más fuertes de cada antígeno. Estas pruebas también se examinaban a las 24 y a las 48 horas.

Como se describe más adelante, una pequeña proporción de sujetos resultó positiva a 2.8  $\mu\text{g}$  de esferulina y negativas a diluciones de 1:100 de coccidioidina. Se procedió a realizar una nueva prueba de estos sujetos, al cabo de seis semanas, con diluciones de 1:100 de coccidioidina y de 1:10 de coccidioidina e histoplasmina. Además, en los que reaccionaron solo a 28  $\mu\text{g}$  de esferulina o a la dilución de 1:10 de coccidioidina se ensayó la histoplasmina.

CUADRO 1—Proporción de individuos reactivos, Livingston, California.

Antígeno	Dosis	Proporción de positivos
Esferulina	2.8 $\mu\text{g}$	49/298 (16.4%)
Coccidioidina	1:100	37/298 (12.4%)
Esferulina <sup>a</sup>	28 $\mu\text{g}$	10/207 (4.8%)
Coccidioidina <sup>a</sup>	1:10	5/207 (2.4%)

<sup>a</sup> Administrada solo a sujetos no reactivos a las dosis bajas de ambos antígenos.

### Resultados

*Comparación de la esferulina con la coccidioidina.* Se completaron las pruebas con 2.8  $\mu\text{g}$  de esferulina y diluciones al 1:100 de coccidioidina en 298 individuos (cuadro 1); 49 (16.4%) resultaron positivos a la esferulina y 37 (12.4%) a la coccidioidina. Todos los sujetos que reaccionaron a este último reactivo reaccionaron también al primero; en cambio 12 sujetos positivos a la esferulina no lo fueron a la coccidioidina en tales diluciones.

Diez (4.8%) de los 207 individuos que no reaccionaron a la dilución al 1:100 de coccidioidina ni a 2.8  $\mu\text{g}$  de esferulina, resultaron positivos a 28  $\mu\text{g}$  de esferulina, y cinco (2.4%) a la dilución al 1:10 de coccidioidina (cuadro 2). Cuatro sujetos reaccio-

CUADRO 2—Reacciones de sensibilidad en 11 individuos sometidos a prueba cutánea con dosis altas y bajas de coccidioidina y de esferulina; reacciones a la histoplasmina.

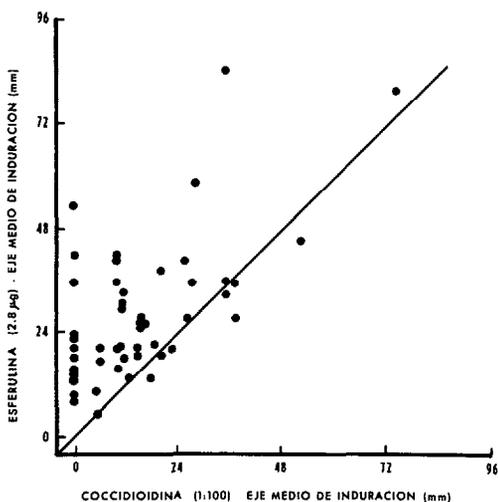
Sujeto	Induración media (mm)				Histoplasmina (dosis estándar)
	Esferulina 2.8 $\mu\text{g}$	Coccidioidina 1:100	Esferulina 28 $\mu\text{g}$	Coccidioidina 1:10	
C.G.	Negativa	Negativa	25	Negativa	26
O.Y.	"	"	20	"	32.5
J.R.	"	"	38.5	"	Negativa
D.C.	"	"	12.5	"	"
S.B.	"	"	5.5	"	"
J.L.	"	"	9	10	"
C.C.	"	"	11	9	"
D.K.	"	"	Negativa	7	"
M.S.	20 <sup>a</sup>	"	45	12	No hay datos
M.M.	Negativa	"	35	10	No hay datos
G.C.	"	"	8.5	Negativa	No hay datos

<sup>a</sup> La reacción se manifestó a las 72 horas.

naron tanto a la dosis 1:10 de coccidioidina como a 28  $\mu\text{g}$  de esferulina; seis resultaron positivos solo a la esferulina y uno a la coccidioidina, en la dilución al 1:10. Un individuo (M. S.), estudiado con las dosis más concentradas de ambos reactivos, reaccionó realmente a 2.8  $\mu\text{g}$  de esferulina. Sin embargo, esta reacción no se manifestó hasta las 72 horas y por ello no figura como positivo en el cuadro 1.

**Comparación del tamaño de las reacciones de esferulina y coccidioidina.** En la figura 1 se compara el tamaño de cada una de las respuestas de los individuos reactivos al primer par de pruebas. En 41 de los 49 individuos, el diámetro medio de induración a 2.8  $\mu\text{g}$  de esferulina, excedió el correspondiente a la dilución 1:100 de coccidioidina. Solo se registró una reacción fuerte. Se trataba de una mujer de 32 años, en buen estado de salud, quien presentó reacciones de induración de 70 x 90 mm con 2.8  $\mu\text{g}$  de esferulina y de 60 x 90 mm con la dilución 1:100 de coccidioidina. Aunque se presentaron vesículas y dolor en ambos sitios, no se observaron síntomas generales.

FIGURA 1—Reacciones dérmicas de sensibilidad retardadas en 49 sujetos sometidos a las pruebas de coccidioidina y de esferulina. (Cada punto representa la lectura mayor de las pruebas observadas a las 24 y 48 horas para cada reactivo.)



**Proporción de las reacciones en función de la duración de la residencia.** El cuadro 3 indica que la proporción de reacciones positivas a 2.8  $\mu\text{g}$  de esferulina y a coccidioidina en la dilución al 1:100, aumentan con el período de residencia en el Valle de San Joaquín. El mayor aumento se observó en el grupo de uno a cinco años de residencia (15% en comparación con 4% para los que habían residido menos de un año). A partir de los cinco años, el aumento fue pequeño. Cabe suponer que algunas reacciones pudieran representar la sensibilidad adquirida en otro lugar; muchos de los sujetos procedían o habían visitado otras zonas endémicas para *C. immitis*.

**Consideraciones de reactividad cruzada.** Diez de los 12 sujetos que reaccionaron a 2.8  $\mu\text{g}$  de esferulina pero no a la dilución de 1:100 de coccidioidina, volvieron a ser sometidos a la prueba con este último reactivo y con diluciones al 1:10 de coccidioidina y de histoplasmina, transcurridas seis semanas. Todos ellos, salvo uno, reaccionaron a ambas diluciones de coccidioidina (cuadro 4) y dos, a la histoplasmina. Ambos procedían de sectores endémicos para la histoplasmosis. Hubo otros dos individuos reactivos a la histoplasmina entre ocho que reaccionaron a 28  $\mu\text{g}$  de esferulina o a la dilución al 1:10 de coccidioidina, o bien a ambas (cuadro 2). Uno de ellos era origi-

CUADRO 3—Proporción de individuos reactivos<sup>a</sup> a 2.8  $\mu\text{g}$  de esferulina y a coccidioidina al 1:100 en función de la duración de la residencia en el Valle de San Joaquín.

Residencia en el Valle de San Joaquín (años)	Antígeno empleado	Número de estudiados	Positivos	
			No.	%
<1	Esferulina	28	1	3.6
	Coccidioidina	28	1	3.6
1-5	Esferulina	79	12	15.2
	Coccidioidina	79	9	11.4
>5	Esferulina	185	36	19.5
	Coccidioidina	185	29	15.7

<sup>a</sup> No se obtuvieron datos sobre la residencia de seis sujetos y por eso no están incluidos.

CUADRO 4—Reacciones de sensibilidad en 10 sujetos positivos a 2.8  $\mu$ g de esferulina y originalmente negativos a coccidiodina al 1:100; reacciones a la histoplasmina.

Sujeto	Induración media (mm)				
	Primera prueba (12-17 de marzo)		Repetición de la prueba (24-28 de abril)		
	Coccidiodina 1:100	Esferulina 2.8 $\mu$ g	Coccidiodina 1:100	Coccidiodina 1:10	Histoplas- mina (dosis estándar)
B.V.	Negativa	35	27.5	45	25
G.F.	"	52.5	43.5	80	25
K.L.	"	12.5	17.5	32	Negativa
M.L.	"	23.5	14	25	"
P.H.	"	17.5	18	35	"
C.M.	"	41.5	9	79	"
N.V.	"	20	18	29	"
R.P.	"	9	Negativa	Negativa	"
L.H.	"	14	5	22.5	"
D.G.	"	15	12	10.5	"

nario de una zona endémica para histoplasmosis; no se pudieron obtener los datos del otro individuo.

#### Discusión

Este estudio muestra la eficacia de la esferulina para detectar la sensibilidad al *C. immitis* con fines epidemiológicos. La dosis de 2.8  $\mu$ g detectó un 32% más de sujetos positivos que la dilución al 1:100 de coccidiodina, observándose solo reacciones adversas locales en un sujeto. Entre los sujetos que resultaron negativos a ambos reactivos en las primeras diluciones, concentraciones 10 veces más fuertes de esferulina, 28  $\mu$ g, detectaron el doble de individuos reactivos que la dilución al 1:10 de coccidiodina. Además, el tamaño de las reacciones con 2.8  $\mu$ g de esferulina (figura 1) fue un poco mayor que el producido por la coccidiodina a una dilución de 1:100, lo que sugiere que aquel reactivo facilitaría la detección de reacciones débiles o limítrofes.

La esferulina, lo mismo que la coccidiodina, mostró una proporción más elevada de reacciones positivas en individuos que habían permanecido por mayor tiempo en las regiones endémicas (cuadro 3). El cambio más importante en tal proporción correspondió al período de uno a cinco años

de residencia, siendo muy limitado el cambio observado a partir de tales años.

La repetición de las pruebas a 10 de los 12 sujetos<sup>5</sup> de este estudio que resultaron positivos a 2.8  $\mu$ g de esferulina pero negativos a la dilución al 1:100 de coccidiodina (cuadro 4), reveló que esta reacción a la esferulina reflejaba, al parecer, experiencias coccidiodicas anteriores. En primer lugar, todos los sujetos, salvo uno (R. P.), manifestaron reactividad a la coccidiodina tanto a la dilución al 1:100 como a la 1:10 cuando volvieron a ser sometidos a la prueba, al cabo de seis semanas. La reacción anterior a 2.8  $\mu$ g de esferulina parece haber activado la sensibilidad latente. Este efecto ha sido también descrito con respecto a la coccidiodina; las dosis fuertes estimulan (8) la capacidad de reacción a la dilución al 1:100. La esferulina, lo mismo que la coccidiodina (1, 2) no sensibiliza a los animales (6) ni al hombre (datos inéditos) en ausencia de una experiencia coccidiodica previa. Tampoco es probable que las respuestas a la coccidiodina representen nuevas infecciones ya que estas pruebas se efectuaron en marzo y abril, al final de la estación de lluvias, época en que no suelen manifestarse casos nuevos. En segundo lugar, en 8 de los 10

<sup>5</sup> No se pudo proceder a la observación ulterior de dos sujetos.

individuos reexaminados, se encontraron indicaciones de que la reacción positiva a la esferulina no era atribuible a la reacción cruzada por *H. capsulatum*. Los otros dos sujetos (B. V. y G. F.), que resultaron positivos a la histoplasmina, tenían antecedentes de residencia y viajes compatibles con la posibilidad de una experiencia micótica dual. Por último, merece mencionarse la prueba positiva a 2.8 µg de esferulina y las pruebas negativas a la coccidioidina en el caso de R. P. (cuadro 4). Se trataba de un individuo de 70 años había vivido por largo tiempo en el Valle de San Joaquín y que tenía antecedentes de coccidioidomycosis comprobada. Posiblemente su umbral de sensibilidad era insuficiente para ser detectado por cualquiera de las dos dosis de coccidioidina.

La dosis fuerte de coccidioidina (1:10) es considerablemente menos específica que la dilución al 1:100, en especial cuando se trata de sujetos con experiencia histoplasmática anterior (2). Para determinar si la dosis fuerte de esferulina tenía posibilidades similares de reacción cruzada, se sometieron a la prueba de histoplasmina 7 de los 10 sujetos positivos a 28 µg de esferulina (cuadro 2). Dos resultaron positivos a la prueba de la histoplasmina, pero en estos casos no fue posible descartar la posibilidad de experiencias micóticas anteriores. Las reacciones con 28 µg de esferulina observadas en los otros cinco se debieron evidentemente a una experiencia previa con *H. capsulatum*. Se espera investigar con mayor detenimiento la especificidad de la esferulina en una muestra de población más numerosa y que resida en una zona exclusivamente endémica para el *H. capsulatum*.

También se están llevando a cabo estudios clínicos para determinar la eficacia de este reactivo en enfermos con coccidioidomycosis activa. En casos de enfermedades pulmonares cavernosas crónicas cavitarias (9), de enfermedades pulmonares agudas (10) y de enfermedades diseminadas (3), la coccidioidina es, a menudo, no reactiva.

#### Resumen

Se comparó la esferulina, un nuevo reactivo, con la coccidioidina para detectar la hipersensibilidad dérmica retardada en 298 individuos residentes en una zona endémica para *Coccidioides immitis*. En dosis normales (diluidas), la esferulina detectó un 32% más de individuos positivos que la coccidioidina. Una concentración 10 veces más fuerte de esferulina mostró un 50.0% más de reacciones positivas que la dosis 10 veces más fuerte de coccidioidina, en sujetos que no reaccionaron a las dosis normales de estos reactivos. Solo se observaron reacciones locales graves, producidas por las dosis bajas de coccidioidina y esferulina en un sujeto. Se presentan datos que indican que la sensibilidad latente a la coccidioidina puede ser puesta de manifiesto por una reacción con esferulina. □

#### Agradecimientos

Los autores expresan su gratitud, por la cooperación recibida, en los aspectos prácticos de este estudio, al personal de Foster Farms, Inc., Livingston, California, al Dr. Everett Johnson, Profesor Clínico Asociado de Medicina de la Comunidad, Universidad de Stanford y ex Director del Centro de Salud de la Comunidad de Livingston y al Sr. Lawrence Blaine, antiguo becario predoctoral, División de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Stanford.

#### REFERENCIAS

- (1) Smith, C. E., E. G. Whiting, E. E. Baker, et al. The use of coccidioidin. *Am Rev Tuberc* 57:330-360, 1948.
- (2) Smith, C. E., M. T. Saito, y R. R. Beard, et al. Histoplasmin sensitivity and coccidioid infection: occurrence of cross-reactions. *Am J Public Health* 39:722-736, 1949.
- (3) Fiese, M. J. *Coccidioidomycosis*. Charles C. Thomas: Springfield, Illinois, 1958.
- (4) Kong, Yi-chi M., D. C. Savage, y L. M. Kong. Delayed dermal sensitivity in mice

- to spherule and mycelial extracts of *Coccidioides immitis*. *J Bact* 91:876-883, 1966.
- (5) Levine, H. B., J. M. Cobb, y G. M. Scalapone. Spherule coccidioidin in delayed dermal sensitivity reactions of experimental animals. *Sabouraudia* 7:20-32, 1969.
- (6) Scalapone, G. M., H. B. Levine, y S. D. Chaparas, et al. Properties and assay of spherulins from *Coccidioides immitis* in delayed sensitivity of Animals. *Sabouraudia* (en prensa) 1974.
- (7) Levine, H. B., A. González Ochoa, y D. R. Ten Eyck. Dermal sensitivity to *Coccidioides immitis*. *Am Rev Resp Dis* 107:379-386, 1973.
- (8) Rapaport, F. T., H. S. Lawrence, y J. W. Millar, et al. The immunologic properties of coccidioidin as a skin test reagent in man. *J Immun* 84:368-373, 1960.
- (9) Hyde, L. Coccidioidal pulmonary cavitation. *Dis Chest* 54 (Suppl) 1:273-277, 1968.
- (10) Werner, S. B., D. Pappagianis, y I. Heindl, et al. An epidemic of coccidioidomycosis among archaeology students in Northern California. *New England J Med* 286:507-512, 1972.

#### Dermal sensitivity to different doses of spherulin and coccidioidin (Summary)

Spherulin, a new reagent, was compared with coccidioidin for eliciting delayed dermal hypersensitivity in 298 human subjects living in an area endemic for *Coccidioides immitis*. As standard (dilute) doses, spherulin detected 32% more reactors than coccidioidin. A 10-fold higher concentration of spherulin showed a 50% higher reactor ratio than did a 10-fold

higher dose of coccidioidin in subjects non-reactive to the standard dose of either reagent. Severe local reactions were encountered in only one subject; these reactions were produced by the low doses of both coccidioidin and spherulin. Evidence is presented that latent sensitivity to coccidioidin can be made apparent by a reaction to spherulin.

#### A dermossensibilidade a diferentes doses de esferulina e coccidioidina (Resumo)

Comparou-se a esferulina, um novo reagente, com a coccidioidina, para induzir a hipersensibilidade dérmica tardia em 298 indivíduos residentes numa zona endêmica de *Coccidioides immitis*. Em doses normais (diluídas), a esferulina detectou 32% reagentes a mais do que a coccidioidina. Uma concentração 10 vezes mais forte de esferulina revelou uma razão de reagentes 50% maior do que numa dose 10

vezes mais forte de coccidioidina em indivíduos que não reagiram à dose normal de nenhum dos reagentes. Apenas em um indivíduo observaram-se reações localizadas severas, produzidas pelas doses baixas de coccidioidina e esferulina. Apresentam-se dados que indicam que a sensibilidade latente à coccidioidina pode ser revelada por uma reação à esferulina.

#### Sensibilité dermique à différentes doses de sphéruline et de coccidioidine (Résumé)

Des chercheurs ont comparé la sphéruline, un nouveau réactif, à la coccidioidine pour provoquer l'hypersensibilité dermique retardée chez 298 individus résidant dans une zone endémique de *Coccidioides immitis*. A doses normales (diluées), la sphéruline a permis de dépister un nombre de cas supérieur de 32 pour 100 à celui dépisté par la coccidioidine. Une concentration 10 fois plus forte de sphéruline a révélé un nombre de cas de 50 pour 100

supérieur au nombre obtenu avec une dose égale de coccidioidine chez des personnes qui ne réagissaient pas à une dose normale de ces réactifs. Chez une personne seulement, les chercheurs ont observé sévères réactions locales produites par les faibles doses de coccidioidine et de sphéruline administrées. L'article fournit des données qui montrent que la sensibilité latente à la coccidioidine peut être mise en évidence par une réaction avec la sphéruline.