



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores. Cuautitlán

*“Producción de Antígenos
de Hongos Mucoráceos”*



T E S I S

Que para obtener el Título de:

Química Farmacéutica Bióloga.

P r e s e n t a :

Lucila Aurora Dominguez Chequer

Director de Tesis: Ph. D. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares

Cuautitlán Izcalli., Méx.

1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Págs.
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	3
II. OBJETIVOS	9
III. MATERIALES Y METODOS	10
A. MATERIALES	10
1.- Cepas de Hongos Mucoraceos	10
2.- Extractos antigénicos Somáticos y Metabólicos	10
3.- Medios de Cultivo	11
4.- Soluciones reguladoras	11
5.- Preservadores	12
6.- Soluciones	13
B. METODOS	
1.- Identificación de Cepas	15
2.- Preparación de Antígenos	24
a) Obtención de Antígenos metabólicos	24
b) Obtención de Antígenos somáticos	25
3.- Producción de Antisueros	28
4.- Pruebas serológicas para detección de antisueros contra mucorales	30
a) Prueba de precipitación en tubo capilar	30
b) Microtécnica de doble inmunodifusión por el - método de Ouchterlony	30
c) Titulación de extractos antigénicos	34
d) Prueba de contraelectroforesis	35
5.- Determinación de posible similitud antigénica entre especies mucoraceas	37
6.- Demostración de posibles reacciones cruzadas con otros antígenos de familia diferente	37

7.- Zigomicosis experimental en conejos	ix	38
a) Cultivos		38
b) Animales de experimentación		38
c) Preparación de esporas e inoculación		38
d) Estudios realizados antes y después del sacrificio de los animales		39
8.- Pruebas de Diagnóstico de zigomicosis en suero humano		39
a) Antecedentes clínicos		39
b) Procedimiento serológico		40
IV. RESULTADOS		42
1.- Análisis de los antígenos producidos		42
2.- Resultados en el estudio de los animales infectados con agentes Mucoraceos		48
3.- Análisis del caso del paciente sospechoso de zigomicosis		49
V. DISCUSION DE RESULTADOS		54
VI. CONCLUSIONES		63
VII. BIBLIOGRAFIA		65
VIII. LISTA DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS		73
IX. ABREVIATURAS UTILIZADAS		74

RESUMEN

Un método para la elaboración de antígenos de agentes Mucoraceos fué desarrollado. Estos antígenos fueron probados mediante las técnicas de IDD y CIE, recurriendo al empleo de inmunosueros experimentales preparados en conejos contra antígenos especie-específicos de la familia Mucoracea. Su posterior análisis antigénico tanto de los antígenos somáticos como metabólicos mostró similitud antigénica entre las especies estudiadas Rhizopus arrhizus, Rhizopus rhizopodiformis, Absidia hualcepora, Absidia corymbifera, no así con el extracto antigénico somático de Mucor subtilis, no mostraron reacciones cruzadas con antígenos de otras clases micóticas (Aspergillus fumigatus y Candida albicans) ni con los controles sanos.

El empleo de la microtécnica de doble inmunodifusión resultó ser simple y específica, además de que la cantidad de reactantes requerida es muy pequeña, reproducible en sus resultados y el tiempo que se ocupa en aparecer la reacción de precipitación es relativamente corto (24 horas), por lo que fué evaluada en el inmunodiagnóstico de la zigomicosis.

Con los antígenos somáticos se detectó una precipitación más definida que con los antígenos metabólicos, por lo que las pruebas de inmunodiagnóstico se efectuaron con los primeros, sirviéndonos de gran ayuda diagnóstica para ampliar el criterio hasta ahora establecido solo por la identificación del hongo por microscopía directa y cultivo de aspirados, así como estudios histopatológicos de biopsias, cuya elaboración requiere de mucho tiempo para dar un fallo definitivo. El empleo de los antígenos producidos en la prueba de IDD implementada tiene la ventaja de que tan solo puede ayudar a dar un

pronóstico en corto tiempo, sino que también nos puede servir de guía para evaluar si la terapia es adecuada y la infección esta siendo controlada, como reseña en el caso de un paciente sospechoso de ---- zigomicosis en el presente trabajo.

I.- INTRODUCCION

La familia Mucoracea está integrada por hongos microscópicos filamentosos raramente septados, que se encuentran diseminados en la naturaleza, subsistiendo sobre vegetales en descomposición y diversos materiales orgánicos. Es la familia más patógena de las catorce que existen en el orden de los Mucorales, ya que inician infecciones agresivas y letales bajo ciertas condiciones como lo es un estado de deficiencia orgánica, considerados por lo tanto como oportunistas. Los géneros Rhizopus, Absidia y Mucor son los más frecuentemente encontrados como causantes de las infecciones humanas denominadas con el nombre genérico de zigomicosis, estas pueden ser cutáneas, cerebrales, pulmonares o bien sistémicas atacando diversos órganos vitales. (1, 6, 11, 14, 18, 20, 24, 29, 31, 37, 42)

En 1973 Meyer y Armstrong revisaron las diversas manifestaciones clínicas de este tipo de micosis, de los cuales el 50 % correspondió a la forma rinocerebral, de donde más del 75 % fueron pacientes con acidosis diabética. Lo anterior se podría explicar por el hecho de que este hongo tiene una predilección por el pH ácido, alta temperatura y alto contenido de glucosa, si añadimos que la función leucocitaria está disminuida durante la ketoacidosis, como algunos estudios lo indican, la inmunidad natural decrecerá. Sin embargo el mecanismo hasta ahora es desconocido. (23, 24, 26, 27)

Según la tabulación realizada por Simson y colaboradores (1964) sobre desordenes asociados a zigomicosis, las condiciones predisponentes más comunes son la leucemia, linfomas y diabetes mellitus, - este última controlada o no y especialmente con acidosis.

Es indiscutible la importancia que tienen las alteraciones -- metabólicas, el advenimiento de nuevas modalidades terapéuticas como el uso indiscriminado de antimicrobianos, antimetabolitos, corticosteroides y otros fármacos, para que un hongo normalmente no patógeno produzca infección, como ha sido demostrado experimentalmente por diversos autores al inducir la infección en animales, mediante la inoculación de cultivos de hongos Mucoraceae, después de provocar diabetes mellitus aloxónica o bien previa administración de glucocorticoides y corticosteroides, comparando la susceptibilidad con la de animales sanos. De esta manera se explica el porque a últimas fechas se ha reportado un alto número de casos de zigomicosis, en su mayoría diagnosticados desafortunadamente durante la autopsia y muchas veces sin llegar al veredicto específico. (1, 2, 3, 13, 18, 32, 43, 44)

Después del primer caso de zigomicosis publicado en la bibliografía mexicana en el año de 1961 por García Ramos Alonso y Brandt, correspondiente a una persona con endocarditis bacteriana y fiebre reumática, en quien se rectificó durante la autopsia la presencia de trombos pulmonares con hifas catalogadas como Mucor sp., se han reportado dos casos de zigomicosis rinocerebral, encontrándose aún con vida el paciente, uno en 1970 por Rodríguez Trujillo, Ahumada Padilla, Ramírez Rivera y Sánchez Cabrera, al parecer el primer caso en nuestro país en que se llega al diagnóstico hasta especie, coincidiendo en la invasión tisular Rhizopus arrhizus y Candida albicans; y otro en 1976 por A. Tamayo y colaboradores del Hospital de Especialidades del Instituto Mexicano del Seguro Social de Puebla, llegando a la identificación de Rhizopus arrhizus y Candida al

bicans en biopsias de lesiones ulceradas mucopurulentas localizadas en el paladar de un paciente diabético. No se puede decir que estos sean los únicos casos prevalescentes en el país pero sí los publicados. Cabe señalar que esto ocurre con todas las micosis, debido quizás a la dificultad para diagnosticar. (16, 34, 37, 42)

Aunque es generalmente aceptado que el diagnóstico temprano da ría la clave para el tratamiento adecuado, en zigomicosis el problema que se presenta es establecer cual podría ser el método más satisfactorio si se tiene en conocimiento características notables en esta enfermedad como son: la invasión de los agentes micóticos a los tejidos con producción de exudado necrótico, tendiendo hacia vasos sanguíneos y una posible trombosis. El utilizado hasta el momento requiere de un personal altamente calificado en el terreno de la micología, pues se basa en la identificación del hongo a partir de repetidos cultivos de aspirados de biopsias obtenidas del sitio infectado. Además de estudios microscópicos directos de los productos, el estudio histopatológico en caso de tratarse de biopsias, es fundamental para establecer un fallo definitivo. Los estudios radiográficos y radionucleares pueden servir de ayuda, pero hay que tomar en consideración que en algunas ocasiones han resultado negativos cuando la infección está presente o bien dar falsos positivos. (6, 7, 24, 53, 40)

Teniendo en cuenta que este tipo de diagnóstico no es muy rápido y confiable, nos lleva a la necesidad de buscar otros prospectos que ratifiquen las pruebas anteriores, principalmente en la rama inmunológica.

La descripción del hongo como grupo "mutable y falso" por Albrech von Haller hace 200 años, y que hasta la fecha no se ha revocado, reflejan las dificultades que se presentan en la inmunología micótica. La uniformidad de métodos y mejor conocimiento de la química de antígenos micóticos ayuda a salvar algunos de esos problemas. Generalmente el inmunodiagnóstico micótico confie en una de dos proposiciones generales: la demostración de anticuerpos reactivos del suero con antígenos, o la demostración de antígenos micóticos circulantes. (6, 8, 14, 18, 24, 30)

Durante los años recientes, las reacciones de precipitación en donde la difusión directa de antígeno y anticuerpo reaccionan en bases semisólidas, se han vuelto herramientas esenciales en análisis bioquímicos. Son particularmente útiles porque tienen el poder de separar y distinguir reacciones particulares antígeno-anticuerpo entre mezclas de tales sistemas. Si alguna de esas reacciones simples pueden ser correlacionadas con infecciones específicas, serán altamente reproducibles en el laboratorio lo cual ayudará al diagnóstico de la enfermedad. Estas técnicas generalmente caen dentro de tres categorías distintas: difusión simple, doble difusión e inmunoelectroforesis, requiriendo solo un entendimiento de factores bioquímicos involucrados en éstos. (4, 5, 8, 18, 19, 30).

En tal sentido, la información contenida de resultados optimistas, al poner de manifiesto la presencia de anticuerpos en sueros de personas con infecciones micóticas en fase temprana tales como: aspergilosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis entre otras, -- mantiene la esperanza de encontrar un método que de la pauta para-

ayudar a contrarrestar la zigomicosis. (4, 21, 28, 33, 41, 46, 47)

Desafortunadamente son pocos los reportes de inmunoensayos en este tipo de infección. Así tenemos los realizados por Smith (1977) quien utilizó preparaciones de antígenos totales y sueros de pacientes enfermos, probandolos por el método de contraelectroforesis obtuvo un alto grado de especificidad; este trabajo en complemento con el de Jones y Kaufman (1978) quienes detectaron en forma indirecta la existencia de antígenos comunes en la familia Mucoraceae por medio de inmunodifusión radial utilizando para ello antígenos somáticos producidos por ellos mismos, demostraron también la presencia de anticuerpos en sueros de pacientes con la enfermedad clínica manifiesta. El empleo de una prueba de inmunofluorescencia indirecta y contraelectroforesis sirvió para ratificar la presencia de anticuerpos en un paciente con zigomicosis orofaríngeal - por Yankey y Abram (1993), definieron a la inmunofluorescencia como una prueba tan rápida como la contraelectroforesis, pero más sensible y específica.

De acuerdo a la infraestructura con que cuenta nuestro país, - en particular un laboratorio de análisis clínicos de rutina, se ve la urgencia de un método no muy costoso, sencillo, confiable y reproducible en sus resultados, por lo cual se pensó en las técnicas de inmunodifusión doble y contraelectroforesis para la detección de anticuerpos, requiriendo por primera instancia los antígenos mucoráceos purificados. La difusión doble en gel es la prueba más -- más práctica para ser usada en el inmunodiagnóstico de enfermedades micóticas, descrita por Tuchterlony, ha sido aplicada en numerosos

estudios de varias infecciones micóticas incluyendo aspergilosis, candidiasis, coccidioidomicosis, cromomicosis, histoplasmosis, nocardiasis, paracoccidioidomicosis y esporotricosis. Este método solamente es limitado por el riesgo de reacciones falsos positivos debido a la compartición de antígenos comunes con algunos hongos patógenos diferentes a los estudiados; también por el hecho de que se requieren grandes cantidades de los reactantes aproximadamente 150 micro litros de antígeno y antisuero.

Este trabajo tuvo como principal finalidad la producción de antígenos mucoráceos para ser utilizados en las técnicas mencionadas anteriormente, se determinó si son lo suficientemente específicos, analizando su similaridad antigénica, con esto se elimina una posible limitante para la prueba, además se realizaron ciertas modificaciones a la técnica para reducir el volumen ocupado de los reactantes, con esto se descartó la segunda limitante.

Como una posible utilidad diagnóstica de este estudio, se presenta el caso de un paciente con lesiones sugerentes a una infección por zigomicetos a nivel subcutáneo en mano y brazo izquierdo, teniendo como antecedente haber recibido tratamiento antibacteriano durante un año sin previos análisis; más tarde fué correctamente diagnosticado en el laboratorio de Micología en la Unidad de Investigación y Postgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, por medio de un examen microscópico directo y confirmando el resultado con la prueba de doble inmunodifusión utilizando para ello los antígenos producidos, procediendo inmediatamente al tratamiento adecuado hasta la resolución del problema.

II.- OBJETIVOS

1. Producir antígenos a partir de diferentes especies de Zigomicetos con el fin de implementar pruebas de doble inmunodifusión y contraelectroforesis para la demonstración de anticuerpos.

2. Verificar la utilidad de los antígenos mucorales producidos en el serodiagnóstico de zigomicosis en pacientes sospechosos de haber contraído la enfermedad, realizando para tal evento la técnica de doble inmunodifusión.

III.- MATERIALES Y METODOS

A.- MATERIALES

1. CEPAS DE HONGOS MUCORACEOS

a) Rhizopus arrhizus

procedente de alimento contaminado para animales.

b) Rhizopus rhizopodiformis

Procedente de tortilla en descomposición.

c) Absidia hyalospora

Procedente de tortilla en descomposición.

d) Absidia corymbifera

Procedente de alimento contaminado para animales.

e) Fycom subtilis

Obtenido de la colección del laboratorio de Micología del Instituto de Investigaciones Pecuarias de Palo Alto, México D. F.

Las cepas obtenidas de diversos materiales orgánicos como : tortilla y alimento para animales, fueron aislados de cultivos seriados, siguiendo el método de identificación descrito posteriormente. Conservadas a 4 °C en tubos conteniendo GDA con tapón de rosca.

2. EXTRACTOS SOMATICOS Y METABOLICOS

- a) De cada cepa de hongo Mucoraceo anteriormente señalados, obtenidos de acuerdo a la metodología descrita en el presente trabajo.

- b) De Aspergillus fumigatus: Procedente del laboratorio de Micología en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán- UNAM.
- c) De Candida albicans: procedente del laboratorio de Micología la unidad de Investigación y Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán- UNAM.

Todos los extractos fueron almacenados bajo congelación.

3. MEDIOS DE CULTIVO

- a) Agar Sabouraud dextrosa (SDA)
- b) Agar Sabouraud dextrosa papa (SDP)
- c) Caldo Sabouraud dextrosa

Los medios eran marca Sioxón de México, preparados de acuerdo a las instrucciones señaladas y esterilizados a 15 lb, sig^2 de presión de vapor (121°C) por 15 min.

4. SOLUCIONES REGULADORAS

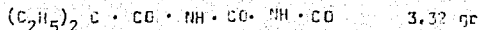
- a) BUFFER DE FOSFATOS-SALINA (PBS) pH 7.2

Composición por litro

Cloruro de Sodio NaCl	8.0 gr
Fosfato Monoácido de Potasio K_2HPO_4	1.21 gr
Fosfato Diácido de Potasio KH_2PO_4	0.34 gr

- b) BUFFER DE VERONAL (BARBITONE) pH 8.2

Acido Dietil Barbitúrico (Barbitone)



Barbitone Dietil de Sodio (Barbitone Sodium)

$(C_5H_5)_2 C \cdot CO \cdot NH \cdot C \cdot CCNa$	25.52 gr
Azida de Sodio NaN_3	2.0 gr
Agua destilada	2.0 gr

Se disolvió el barbitone en 200 ml de agua caliente, por separado fué disuelto el Barbitone Sodium en 1500 ml de agua destilada. Las soluciones se mezclaron y fueron llevadas a 2000 ml. La azida de sodio se adicionó como preservador.

5. PRESERVADORES

a) AZIDA DE SODIO NaN_3 . SOLUCION PATRON.

Azida de Sodio	5.0 gr
Agua destilada	100.0 gr

Disolver la azida de Sodio en el agua destilada. Es adicionada a las soluciones como preservador a una concentración final de 1.0 gr/lit. (0.1%).

b) SOLUCION PATRON DE MERTIOURATE

Mercurial	1.0 gr
Agua destilada	100.0 ml

Disolver el mercurial en 50 ml de agua destilada, aforar a 100 ml. En cultivos se adicionó a una concentración final de 1:10 000.

6. SOLUCIONES

6. SOLUCIONES

a) CITRATO DE SODIO AL 1%

Citrato Trisódico $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0 gr
Agua destilada	100.0 ml

b) HIDRÓXIDO DE SODIO 0.1 N

Hidróxido de sodio NaOH	2.0 gr
Agua destilada	500.0 ml

Se tituló la solución con Acido Clorhídrico HCl 0.1 N

c) PARA DETERMINACION DE PROTEINAS (LOCRY)

SOLUCION A

Carbonato de Sodio Na_2CO_3 al 2% en Hidróxido de Sodio - NaOH 0.1 N

SOLUCION B

Sulfato de Cobre pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en Citrato de Sodio al 1%.

SOLUCION C

Se preparó con 50 ml de la solución A y 1 ml de la solución B. La solución es inestable y debe ser descartada después de un día.

REACTIVO DE FENOL DE FOLIN-CIOCALTEU (DE FENOL COMERCIAL)

Para obtener la solución de trabajo 1 N, se tituló 1 ml de la solución comercial 1.0 N con NaOH 0.1 N, utilizando fenolftaleína como indicador. Diluirlo con Acido. Fue mantenido en frasco ambar a 4°C.

d) HIDROXIDO DE POTASIO AL 10%		
Hidróxido de Potasio KCH		10.0 gr
Agua destilada		100.0 ml
e) TWEEN 80 al 1%		
Tween 80		0.25 ml
Agua destilada		25.0 ml
f) CITRATO DE SODIO AL 5%		
Citrato trisódico $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		5.0 gr
Agua destilada		100.0 ml
g) COLORANTE AMIDO BLACK		
Amido (Naphtalene) Black		1.0 gr
Metanol-Acido Acético Glacial-Agua 5:1:4		1.0 lt
h) COLORANTE AZUL DE COOMASSIE		
Azul de Coomassie		2.5 gr
Acido Acético		100.0 ml
Metanol		500.0 ml
Agua Destilada		400.0 ml
i) FLUIDO DESTIÑIDOR DE GEL (SOLUCION DE LAVADO)		
Metanol		500.0 ml
Acido Acético Glacial		100.0 ml
Agua destilada		400.0 ml

Los ingredientes fueron mezclados y almacenados en frascos ambar. Se filtró antes de usarse.

j) AZUL DE ALGODÓN LACTOFENOL

SOLUCIÓN A: SOLUCIÓN ACLARANTE (LACTOFENOL)

Cristales de fenol	20.0 gr
Acido Láctico	20.0 gr
Glicerina	40.0 gr
Agua destilada	20.0 ml

Disolver en el agua destilada el fenol, en baño de María, agregar el ácido láctico y la glicerina.

SOLUCIÓN B: AZUL DE ALGODÓN LACTOFENOL

Colorante azul de algodón	0.25 gr
---------------------------	---------

A la solución aclarante se le adicionó el colorante azul de algodón y se filtró antes de usarse.

k) AGAR BUFFERADO PARA DOBLE INMUNODIFUSIÓN Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Buffer de Veronal	100.0 ml
Agarosa	2.0 gr
Agua destilada	100.0 ml
Azida de Sodio al 5%	1.0 ml

Se disolvió la agarosa en el buffer de Veronal y agua destilada para su total disolución se calentó a 56°C. La azida de sodio se adicionó como preservador. La solución puede ser almacenada a 4°C.

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

B.- METODOS

1.- IDENTIFICACION DE CEPAS

Se colectaron cepas de zigomicetos provenientes de diversos -- materiales orgánicos, procediendo a su purificación mediante -- diluciones continuas de éstos en agua estéril, cultivando -- cada una de ellas por colonia única en Agar dextrosa papa (ADP) para su mejor desarrollo. Se realizó la identificación pre-- liminar, atendiendo a las características generales del hongo -- tanto macroscópicas como microscópicas (36), esta última por -- medio de tinción de la muestra con azul de algodón lactofenol (Ver Cuadro 3.1). Posteriormente se realizó la identificación del género. Siendo necesario el desarrollo pleno de todas las estructuras del hongo, se utilizó el método de microcultivo -- (Ridell, 1950) (5) que comprende el cultivo de cada cepa en -- ADP, colocado en portaobjetos, esto permitió un estudio exacto de las características morfológicas del hongo total, así como de sus esporas y las relaciones espora-micelio, al ser observa das al microscopio con azul de algodón lactofenol (Ver Cuadro 3.2). Para la identificación hasta especie se tomó como base -- la clasificación de agentes mucoraceos realizada por Scholer y Müller (36), que comprende el cultivo de las cepas en ADP a -- diferentes temperaturas, detectando la máxima en que aún se -- observa crecimiento (Ver Cuadro 3.3) (9, 29, 31).

CUADRO 3.1

CLASIFICACION DE LOS PRINCIPALES GENEROS DE LA FAMILIA MUCORACEA
EN CUANTO A SU MORFOLOGIA COLONIAL

GENERO DEL HONGO	TIEMPO DE CRECIMIENTO	ASPECTO	TEXTURA
<u>Absidia spp.</u>	Crece rápidamente a temperatura ambiente 12-24 hrs.	Denso, agrupado	Lanoso, aterciopelada, resistente.
<u>Mucor spp.</u>	Crece rápidamente a temperatura ambiente.	Denso, aceitoso	Algodonoso, resistente, aterciopelada.
<u>Rhizopus spp.</u>	Crece rápidamente a temperatura ambiente. 12-24 hrs	Denso, esporangio observado a simple vista.	Algodonoso

Cont. CUADRO 3.1

GENERO DEL HONGO	PIGMENTACION	DIFUSION DEL PIGMENTO AL REVERSO DE LA COLONIA.
<u>Aspidia spp.</u>	Blanca cuando joven, gris o café cuando vieja.	A las 24 hrs. pálido a las siguientes 24 hrs. amarillenta.
<u>Mucor spp.</u>	Blanca cuando joven, amarillenta a grisacea cuando vieja.	A las 24 hrs. pálido siguientes 24 hrs. - amarillenta.
<u>Rhizopus spp.</u>	Blanca cuando joven, gris, café-verdoso - a negra cuando vieja	Pálido.
FUENTE: The Medical Mycology Handbook by Campbell, C. M., Stewart, J. L. (1980).		

CUADRO 3.2

CLASIFICACION DE ZIGOMICETOS DE ACUERDO A SUS CARACTERISTICAS
MORFOLOGICAS MAS IMPORTANTES

ZIGOMICETOS	CELCNIA	ESPORANGIO	ESPORANGIOFERO
<u>Rhizopus spp.</u>	Algodonosa, densa, color gris, café a negra.	Semiesférico, café o negro.	No ramificado, (si lo está, -- solamente cerrado al grupo) -- originado dis-- tintos rizoides
<u>R. Homothallicus</u>	Algodonosa, gris.	Semiesférico	No ramificado, corto.
<u>R. arrhizus</u>	Denso, algodónoso- color gris a negro Reverso pálido.	Semiesférico, visto macroscópicamente, 100-200 μ diámetro o mas.	Puede ser ramificado, más largo de 1 mm, con membrana lisa - café
<u>R. rhizopodiformis</u>	Café grisáceo, verdoso, algodónoso, reverso de la colonia pálido.	Redondo, aplastado al final 66.6-140 μ diámetro.	Sólo o en grupos, más largo de 1 mm.
<u>R. microsporus</u>	Algodonosa, gris a negra	Semiesférico 100-200 μ diámetro.	Más largo de 1 mm.
<u>R. oligosporus</u>	Algodonosa, gris a café.	Redondo, 100-120 μ diámetro o más pero menor de 140 μ .	No ramificado, más de 1 mm de longitud.
<u>R. nigricans</u>	Densa, algodónosa gris a negra	Semiesférica 100-350 μ diámetro.	En grupos de 2 a 3 o más, de 0.5 a 2 mm de longitud.

Cont. CUADRO 3.2

ZIGOMICETO	CELCNIA	ESPORANGIO	ESPORANGIOFERO
<u>Absidia spp.</u>	Blanca, gris, lanosa.	Piriforme	Raramente o abundantemente ramificado
<u>A. haylospora</u>	Grisáceo, lanosa	Piriforme, - negro cuando es maduro.	Raramente ramificado.
<u>A. corymbifera</u>	Blanca, grisácea, - algodonosa, reverso amarillento en SDA	Piriforme, - gris amarillento opalescente a - gris.	Abundantemente ramificado.

FUENTE: The Medical Mycology Handbook by Campbell, C. M., Stewart, J. L. (1980).

Manual para Identificación de Mucoraceos patógenos por Schöler y Müller, E. (1978).

Cont. CUADRO 3.2

ZIGOMICETOS	ESPORANGIOESPORAS	APOFISIS	HIFA
<u>Rhizopus spp.</u>	Estriadas y anguladas	Corta o ausente	Arqueada, No septada
<u>R. homothallicus</u>	Esporulación asexual débil, zigosporas -- homotáticas.	Ausente	No septada café clara
<u>R. rhizopodiformis.</u>	Pequeñas, estriadas, polimorfas, café azulesas.	Angulada, truncada con collarote algunas veces.	Arqueada
<u>R. microsporus</u>	Forma de limón, romboidal, estriadas, -- más grandes que las de <u>R. arrhizus</u> .	Completamente -- indefinidas, no anguladas.	No septada
<u>R. oligosporus</u>	Polimorfas, poliédricas a subesféricas.	Ausente	No septado Amarillo -- claro.
<u>R. nigricans</u>	No iguales en tamaño y en forma. de 9-12 μ por 7.8 μ . Gris-azuladas.	Ausente	No septado café.
<u>R. arrhizus</u>	Grandes, estriadas -- polimorfas, café.	No angulada, indefinida	No septada café claro
<u>Absidia spp.</u>	De pared lisa, redondas u ovales.	Conical, visible.	Aérea, no septada, -- hialina.
<u>A. hyalospora</u>	Redondas. Diámetro 5	Conical, visible	Aérea, no septada.
<u>A. corymbifera</u>	Ovaladas, lisas, diámetro menor de 5 μ .	Conical, visible	Aérea, no septada, -- hialina.

Cont. CUADRO 3.2

FICOMICETO	RAIZ	COLUMNELA
<u>Rhizopus spp.</u>	Presente al final del esporangioforo, hialinas o café.	Redonda o Hemiesférica.
<u>R. homothallicus</u>	Presente al final del esporangioforo.	Redonda.
<u>R. arrhizus</u>	Presente al final del esporangioforo, hialinas.	Redonda y aplanada - en la unión con el esporangioforo, con membrana.
<u>R. rhizopodiformis.</u>	Pueden ser ramificadas, hialinas o café.	Semiesférica, Ovoides.
<u>R. microsporus</u>	Ramificada, hialina	Semiesférica
<u>R. aliquosporus</u>	Hialinas	Hemiesféricas.
<u>R. nigricans</u>	Bien desarrolladas, amarillo -	Hemiesférica. 70-90 μ
<u>Absidia spp.</u>	Lejana al esporangioforo, hialinas.	Piriformes
<u>A. hyalospora</u>	Lejana al esporangioforo, hialinas	Piriforme
<u>A. corymbifera</u>	Lejana al esporangioforo	Piriforme

FUENTE: The Medical Mycology Handbook by Caphell, C. M., Stewart, J. L. (1980).

Manual para Identificación de Micoraceos Patógenos por Schbler y Miller, E. (1978).

CUADRO 3.3

CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS

ZIGOMICETO	TEMPERATURA					
	22°C	37°C	42°C	45°C	50°C	55°C
<u>Mucor circinalloides</u> -group	†	†	-	-	-	-
<u>M. miehei</u>	†	†	†	†	†	-
<u>M. pusillus</u>	†	†	†	†	†	-
<u>Absidia hyalospora</u>	†	†	†	-	-	-
<u>A. corymbifera</u>	†	†	†	†	†	-
<u>Rhizopus homothallicus</u>	†	†	-	-	-	-
<u>R. arrhizus</u>	†	†	†	-*	-	-
<u>R. rhizopodiformis</u>	†	†	†	†	†*	†*
<u>R. oligosporus</u>	†	†	†	†	-	-
<u>R. nigricans</u>	†	-	-	-	-	-
* Debilmente positivo						

FUENTE; Schöler y Müller
(1978)

2. PREPARACION DE ANTIGENOS MUCOPROTEICOS

Según Jones y Kaufman, la preparación de antígenos a partir de las cepas de los hongos identificados, se realizó de la siguiente manera: con la debida asepsia se preparó una suspensión de esporas tomando tres azadas de cada cepa seleccionada e identificada hasta especie, llevadas a un volumen de 3 ml de solución buffer de fosfatos pH 7.2 estéril contenidos en tubos de ensayo previamente esterilizados, dichas suspensiones fueron agregadas a diferentes matrazos Erlenmeyer con 300 ml de caldo Sabouraud dextrosa estéril para su posterior incubación a 25°C con velocidad constante de 130 rpm - en un agitador rotatorio New Brunswick durante 72 horas, tiempo que alcanza su máximo crecimiento, se inactivaron con thimerosal a una concentración final de 1:10 000, para confirmar la inactivación se procedió a realizar cultivos de cada cepa en ADP, hasta la observación de no crecimiento.

Los cultivos se filtraron a través de papel Whatman núm. 2, recibiendo el filtrado en recipientes estériles. Utilizando tanto la biomasa como el filtrado para la obtención de los antígenos correspondientes siguiendo los métodos que a continuación se describen.

a) OBTENCION DE ANTIGENOS METABOLICOS

El filtrado obtenido se transfirió a una bolsa de diálisis tamaño 8-32/32" para ser dializado contra agua corriente durante 24

horas, posteriormente fué colocada en un recipiente con polietilenglicol (carbowax) a temperatura ambiente durante 12 a 16 horas, de esta manera se concentró hasta una décima parte de su volumen original.

Utilizando filtros millipore Sartorius GmbH-D-34400-Götting - FRG con membranas de 0.45 micras se hizo la esterilización de los concentrados.

La concentración de proteínas de cada filtrado fué determinado por el método de Lowry (25). El volumen total de cada uno se dividió en dos partes, una de ellas se ajustó entre 1 a 2 mg de proteínas/ml de solución. Por último unas gotas de thimerosal fueron adicionadas a los filtrados para evitar su determinación. Se almacenaron en pequeñas alícuotas bajo congelación. (Ver cuadro 3.4)

b) OBTENCIÓN DE ANTIGENOS SOMÁTICOS

Como primer paso se lavaron 5 veces los conjuntos miceliales -- con PBS pH 7.2 más 0.01% de thimerosal. Después se diluyeron con 3 partes de solución anterior, quedando una dilución 1:4, la cual se llevó a un Disruptor Ultrasónico modelo UR-200P Tomy Setko CO. LTD, para provocar el rompimiento de la mayor parte de las estructuras micóticas por intervalos de 5 min., hasta que la examinación microscópica de las muestras teñidas con azul de algodón en lactofenol mostrara la mayor parte destruidas.

Para asegurar la ruptura de estructuras, a la preparación sonicada se le sometió a un tratamiento con 1% de Tween 80, llevándose a 4°C con agitación constante durante 24 horas. Lo anterior se transfirió a bolsas de diálisis tamaño 6-32/32" para eliminar el Tween 80 contra agua entre 24 y 48 horas, los residuos insolubles fueron removidos por centrifugación a 4000 r. p. m. durante 3 horas a 4°C en una centrifuga Sorvall (rotor GSA). El sobrenadante fue separado y esterilizado por filtración millipore con membranas de 0.45 micras. Se determinó a cada homogeneado la concentración de proteínas por el método de Lowry (25). El volumen total del producto final de cada bongo fue dividido en dos partes, en donde a una de ellas se le ajustó la cantidad de proteínas en 1-2 mg/ml. Antes de su almacenamiento en pequeñas alícuotas bajo congelación, se añadieron unas gotas de thimerosal al 1% para prevenir su contaminación (ver cuadro 3.4).

DIAGRAMA 1

OBTENCION DE ANTIGENOS

CEPA DE ZIGOMICETE

IDENTIFICACION DE GENE
TIPO Y ESPECIE.

INOCULACION EN 300 ml
DE CALDO SDA.

CRECIMIENTO DURANTE -
72 hrs. A 25°C Y 150
rpm.

INACTIVACION CON TIME
ROSAL HASTA CONCENTRA
CION DE 1:10 000

FILTRACION EN PAPEL --
WHATMAN NO. 2

LIQUIDO FILTRADO

DIALISIS CONTRA AGUA DESTI-
LADA DURANTE 48-72 hrs.

AGITACION DURANTE 24 hrs a
4°C

ADICION DE SOLUCION AL 1% -
DE TWEEN 80

SONICACION DURANTE 30-60 MI
NUTOS A 6 CICLOS

DILUCION CON SOLUCION SALI-
NA-BUFFER DE FOSFATOS pH 7.2
CON TIMERISAL 0.01% EN PRO-
PORCION 1:4

LAVADO 5 VECES CON SOLUCION
SALINA MAS BUFFER DE FOSFA-
TOS pH 7.2 Y TIMERISAL 0.01%

PAQUETE MICELIAL

CONCENTRACION a 10 ml
POR DIALISIS CONTRA PU-
LITILENGLICOL DE 12-16
hrs.

ESTERILIZACION POR ME-
DIO DE FILTRO MILLIPORE
CON MEMBRANA DE 0.45 .

CENTRIFUGACION A 4000 rpm -
rpm por 3 hrs.

ESTERILIZACION DEL SOBRE-
NADANTE POR FILTRO MILLI-
PORE CON MEMBRANA DE 0.45

ADICION DE 2 GOTAS DE TI-
MEROSAL AL 0.01%

DETERMINACION DE PROTEINA
POR EL METODO DE LOWRY

AJUSTE DE CONCENTRACION -
DE PROTEINAS A 1 mg/ml

ANTIGENO SOMATICO
ALMACENAMIENTO a -4°C

ANTIGENO METABOLICO
ALMACENAMIENTO a -4°C

AJUSTE A CONCENTRACION
DE PROTEINAS a 1 mg/ml

DETERMINACION DE PROTEI
NAS POR METODO DE LOWRY

ADICION DE 2 GOTAS DE -
TIMEROSAL al 0.01%

3. PRODUCCION DE ANTISUEROS.

Los sueros hiperinmunes contra antígenos mucoraceos somáticos y metabólicos producidos, fueron obtenidos de conejos sanos Nueva Zelanda y California de aproximadamente 1 1/2 Kg. de peso, después de llevar a cabo en cada uno de ellos el siguiente esquema de inmunización. Cada conejo fué inoculado con 1 ml de adyuvante completo de Freund, una semana más tarde se inocularon con una emulsión de 1 ml de Adyuvante incompleto de Freund más 1 ml de antígeno mucoraceo, una inoculación similar a la anterior se realizó una semana después. Los adyuvantes y las emulsiones de antígenos en adyuvante fueron inoculados directamente en el área de las dos axilas, repartido el volumen en cada una de ellas. A la semana siguiente se sangraron por punción en la vena marginal de la oreja para realizar una prueba presuntiva en tubo capilar. Al resultar la prueba positiva se procedió a puncionar por vía intracardiaca para la obtención de mayor volumen de suero para ser utilizado en pruebas de inmunodifusión. Los niveles de anticuerpos fueron mantenidos por dosis de refuerzos a intervalos de un mes (Ver Cuadro 3.5). (17)

CUADRO 3.6

PRODUCCION DE SUEROS HIPERINMUNES

ANIMALES DE EXPERIMENTACION UTILIZADOS: 10 conejos machos de 1.5 Kg. de peso

ESQUEMA DE INMUNIZACION

DIA	VIA	DOSIS DE ADYUVANTE	DOSIS DE ANTIGENO SEMANTICO O METABO LICO (1 mg/ml).	CANTIDAD INOCULADA DE SUSPENSION TOTAL
0	IN	1.0 ml de Adyuvante Completo de Freund	-	0.5 ml en c/axila
7	IN	1.0 ml de Adyuvante Incompleto de Freund	1.0 ml	1.0 ml en c/axila
14	IN	1.0 ml de Adyuvante Incompleto de Freund	1.0 ml	1.0 ml en c/axila
21	Sangrar por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja			
22	Demostración de reacción de precipitación entre antígeno-anticuerpo correspondiente, mediante técnica de doble inmunodifusión en gel.			

IN: INTRACULAR

4. PRUEBAS SEROLOGICAS PARA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA MUCCINALES.

4.1. PRUEBA DE PRECIPITACION EN TUBO CAPILAR.

Por capilaridad fueron llenados varios tubos capilares con volúmenes iguales de antígenos somáticos y metabólicos con sus antisueros correspondientes. Se mezclaron perfectamente por inversiones continuas, para después dejarlos reposar durante 24 horas en posición vertical. La detección de precipitación en la interfase indicó reacción antígeno-anticuerpo. Los antígenos producidos también se probaron con sueros de los conejos aún no inmunizados, actuando como controles negativos. (5)

4.2. MICROTECNICA DE DOBLE INMUNODIFUSION POR EL METODO DE COUNTER-LORRY.

En portaobjetos de vidrio tamaño 7.5 x 2.5 cm, limpios y desengrasados, colocados sobre una base fija perfectamente horizontal, se vertieron a 4 ml de la solución de agarosa al 1% con buffer de Veronal pH 8.0-8.2 y azida de sodio 1 mg/ml como preservador.

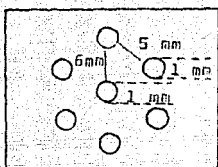
Ya fijada la agarosa se le hicieron horadaciones utilizando para ello perforadores de aproximadamente 2 mm de diámetro de acuerdo al siguiente modelo: Un pozo central fué cortado a una distancia de 6 mm de los pozos que lo rodearon, distancia que fué medida a partir del final de uno de los pozos hacia el final del pozo central. La separación entre cada pozo de la periferia fué de 9 mm --

(Ver fig. 1).

Los pozos llenados usando pipetas Pasteur, aproximadamente 2.5 microlitros tanto de antígenos como de anticueros se requirieron. El número de especímenes y otros detalles relevantes se marcaron sobre el gel con una tinta indelible como la solución acuosa de Alcian -- Blue aplicada con una aguja fina. Para evitar la deshidratación de las placas se colocaron dentro de una caja Petri, en cuya base se puso un poco de agua, manteniéndose a temperatura ambiente por espacio de 24 a 48 horas, tiempo en que las líneas de precipitación aparecieron. La eliminación de posibles falsos positivos debido a los polisacáridos de la preparación de antígenos, se realizó al incubar las placas en Citrato de Sodio al 5% durante 48 min. Posteriormente fueron lavadas por 48 horas con un mínimo de dos cambios de solución buffer de fosfatos pH 7.2. Los cubiertos lavados se llevaron a una estufa bacteriológica a 37°C; una vez deshidratados de 15 días por inmersión en Negro de Anilido o Azul de Coomassie durante 48 min. Se decoloraron con la solución de gel wash en una relación 5:4:1 durante 48 min, haciendo otro cambio con la misma duración. Por último se dejaron las placas al medio ambiente para que se sequen precediendo a la lectura de los resultados, las líneas de precipitación se tiñeron de color azul oscuro. (4)

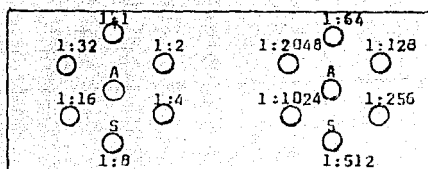
FIGURA (1)

DIAGRAMA BASICO DE LA INMUNODIFUSION DOBLE EN GEL DE AGAROSA



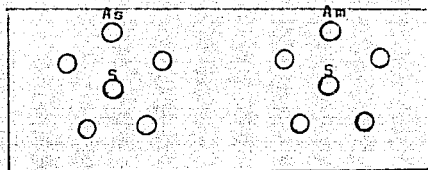
MODELOS DE POZOS PARA INMUNODIFUSION DOBLE EN GEL AGAR

FIGURA (2)



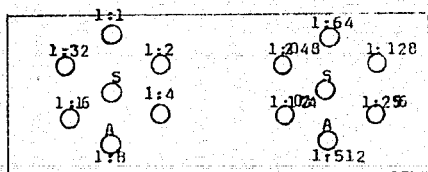
Antígeno en el pozo central en concentración definida. Diluciones -
dobles de suero en los pozos de la periferia, aumentando la dilución
en los pozos que van en sentido de las manecillas del reloj, empezando
de por el suero sin diluir llenando el pozo más superior. (S: suero
A: antígeno).

FIGURA (3)



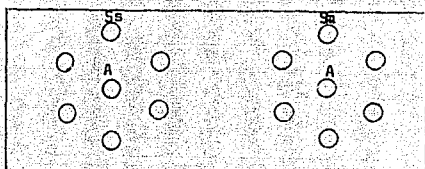
En el pozo central se situa al suero a una concentración definida.
 En los pozos de la periferia se pondrán los diferentes tipos de antígenos a la concentración óptima. (As: antígeno somático; Am: antígeno metabólico)

FIGURA (4)



Los pozos de la periferia contienen diluciones dobles del antígeno con determinada concentración inicial, y en pozo central al suero - concentrado. (A: antígeno; S: suero)

FIGURA (5)



En el pozo central se colocó al antígeno correspondiente, a la concentración óptima determinada para dar reacción antígeno-anticuerpo situando a los diferentes sueros hiperinmunes producidos en conejos experimentales en los pozos de la periferia. (Ss: suero hiperinmune para antígeno somático; Sm: suero hiperinmune para antígeno metabólico).

4.3 TITULACION DE EXTRACTOS ANTIGENICOS.

Diluciones dobles de sueros hiperinmunes con solución salina y el más concentrado se pusieron a reaccionar con antígenos concentrados y soluciones de estos (1 mg/ml, 2 mg/ml y 20 mg/ml) para determinar la concentración óptima requerida. La técnica de Inmunodifusión por el método de Cuchterlony se utilizó, para ello se usaron varios modelos como el de la fig. 2, donde los pozos de la periferia contenían las diluciones de los anticuerpos 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, mientras que en el pozo central se colocó cada concentración de antígeno a probarse. El título registrado fué la dilución más alta de suero que mostró una línea de precipitación contra alguna de las concentraciones del antígeno.

4.4 PRUEBA DE CONTRAINMUNELECTROFESIS (CIE)

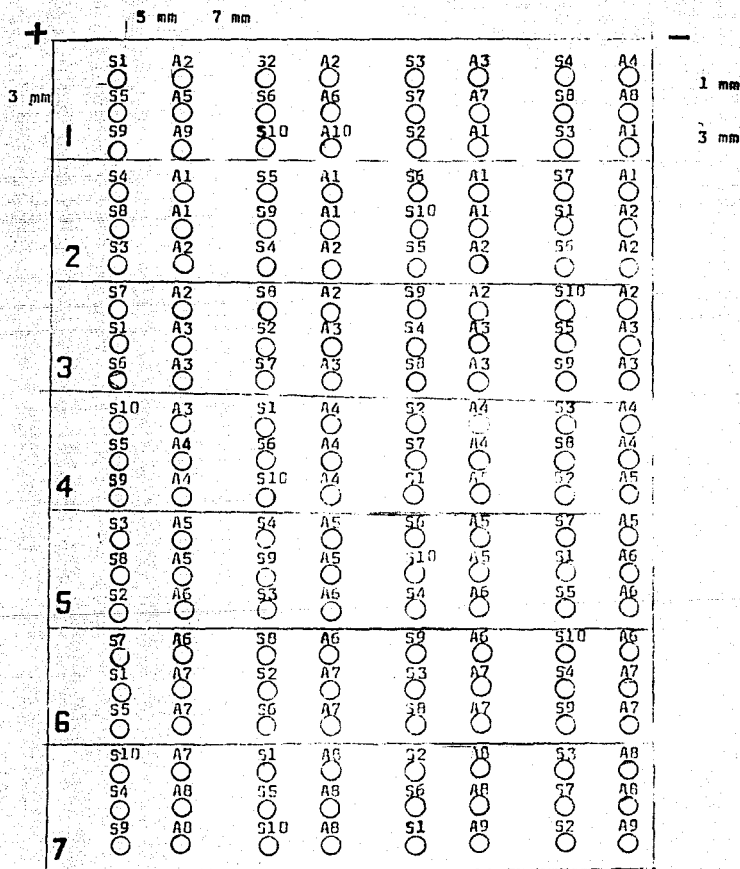
Portaobjetos de vidrio limpios y desengrasados de 7.5 cm x 2.5 cm fijados con solución de agarosa sobre una placa de plástico, soportaron los geles de agarosa al 1% en buffer de Veronal pH 8.2. Se hicieron perforaciones de 1 mm de diámetro en filas paralelas -- separadas por una distancia de 5 mm de final a final de cada pozo. Con pipeta Pasteur, los pozos se llenaron situando a los antígenos en fila opuesta a los sueros (Ver fig. 6).

Se colocó la placa en una cámara de electroforesis que contenía previamente el mismo buffer usado para la agarosa, correspondiendo el ánodo a los pozos de sueros y el cátodo a los pozos de antígenos. Las placas se pusieron en contacto con el buffer por medio de un lienzo nuevo. Los electrodos se conectaron a una fuente de poder con corriente directa, manteniendo el paso de una corriente constante de 2 mA/cm de ancho de cada portaobjetos a través del gel de agarosa durante 45 min., transcurrido este tiempo las placas se llevaron al refrigerador a 4°C por 15 min. Se sumergieron después en solución salina fisiológica por espacio de 15-30 min. Se realizó la lectura; una segunda observación se hizo después de poner la placa en Citrato de Sodio al 5% por 45 min.

Los registros permanentes de las líneas de precipitación se obtuvieron por el mismo procedimiento de lavado, secado y tinte que fué usado en la doble inmunodifusión. (4)

FIGURA (6)

MODELO UTILIZADO EN CONTRAIMUNOELECTROFESIS



S : suero

A : antígeno

5. DETERMINACION DE POSIBLE SIMILARIDAD ANTIGENICA ENTRE ESPECIES MUCORACEAS.

Todos los antígenos producidos fueron probados por IDD y CIE, exponiéndolos contra los sueros hiperinmunes estandarizados a 2 -- mg/ml. El modelo utilizado para IDD correspondió a la fig. 3 y 5 y para CIE a la fig. 6.

6. DEMOSTRACION DE POSIBLES REACCIONES CRUZADAS CON OTROS ANTIGENOS DE FAMILIA DIFERENTE.

Los antígenos de Aspergillus y Candida fueron probados por doble inmunodifusión, colocando el antígeno en cuestión en el pozo central y en los pozos de la periferia a los diferentes anticuerpos obtenidos de animales inmunizados contra los antígenos mucoraceas producidos.

Las concentraciones de antígeno metabólico de Aspergillus utilizadas fueron: 0.3 mg/ml, 3 mg/ml y 30 mg/ml, mientras que a concentraciones de 0.2 mg/ml, 2 mg/ml y 20 mg/ml correspondió al antígeno metabólico de Candida. La prueba se realizó con diluciones dobles de los sueros hiperinmunes, utilizando la técnica de IDD siguiendo el modelo de la fig. 2 y 5.

7. ZIGOMICÓSIS EXPERIMENTAL EN CONEJOS.

7.1 CULTIVOS

Los géneros y especies utilizadas fueron Rhizopus arrhizus, - Rhizopus rhizopodiformis, Absidia corymbifera, Absidia hyaloscopa y Mucor subtilis, que correspondieron a los identificados para la producción de antígenos. Se mantuvieron en medios de cultivo de - ADP.

7.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Conejos sanos Nueva Zelanda con peso aproximado de 2.0-2.7 Kg no trabajados experimentalmente fueron los sujetos de prueba. Se sangraron por la vena marginal antes de ser infectados, para la obtención de suero y ser probados con los antígenos producidos por - IDD, sirviendo como control negativo.

7.3 PREPARACION DE SUSPENSION DE ESPORAS E INOCULACION

Una suspensión de esporas fué preparado por adición de solu- ción salina fisiológica a cultivos en esporulación de 72 horas en ADP. Del esporangio fueron colectadas las esporangiosporas por - raspado con una aza de platino. Las esporas fueron contadas con - una cámara de Neubauer y ajustadas a 10^7 esporas por ml. diluyendo con solución salina fisiológica estéril. Medio mililitro de la - suspensión de esporas fué entonces tomado con una jeringa estéril para ser administrada a los conejos por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja, sucediéndose el mismo volumen de inoculacio-

nes cada 7 días durante un mes y medio; 7 días después de la tercera inoculación, se sangraron por primera vez a los conejos para la obtención del suero (Ver cuadro 3.6). (32)

7.4 ESTUDIOS REALIZADOS ANTES Y DESPUES DEL SACRIFICIO DE LOS ANIMALES INFECTADOS.

Diluciones dobles de los sueros de conejos infectados se probaron por IDD con los antígenos mucoraceos producidos a las concentraciones de 0.2 mg/ml, 2 mg/ml y 20 mg/ml siguiendo la técnica -- del apéndice 4.2 y utilizando el modelo de la Fig. 2. Los conejos fueron sacrificados después de la obtención de diferentes títulos de anticuerpos, extirpándose los siguientes órganos: pulmones, bazo, cerebro, hígado, corazón, estómago, intestinos, riñones, además de muestras de músculo con o sin lesiones obvias, procediendo al cultivo de pequeñas porciones de cada uno en ADP y estudio histopatológico con tinción de Hematoxilina y Eosina.

8. PRUEBA DE DIAGNOSTICO DE ZIGOMICOSIS EN SUERO HUMANO

a) ANTECEDENTES CLINICOS

Paciente de aproximadamente 45 años, campesino, presentaba lesiones severas en mano y brazo izquierdos. Infección causada -- inicialmente por abrasión de la piel de la mano al manipular a sus animales en su trabajo, siguiendo su labor de sembrar la tierra ya con la mano lavada y vendada, a pesar de esta medida la infección se presentó en forma de una lesión eritematosa y fué extendiéndose centrifugamente a formar una papula congestiva, indolora. Esta pergona fué tratada con diversos antibióticos en su area rural sin un análisis previo, no observandose ninguna mejoría, la lesión se desarrolló en el brazo en las condiciones que se describieron al ---

principio. En estas circunstancias fué cuando llegó al Laboratorio de Micología en la Unidad de Investigación y Postgrado de la Facultad de Estudios Superiores- Cuautitlan (UNAM), donde se le tomaron muestras de la lesión para observación microscópica directa con KOH al 10 % y cultivos de las mismas; también se le tomaron muestras de sangre para la demostración de anticuerpos presentes en suero contra algún antígeno micótico.

Otras pruebas que se le realizaron en otros laboratorios fueron: Química Sanguínea, Biometría Hemática, Estudio Parasitológico y Bacteriológico de biopsias y productos de la lesión.

b) PROCEDIMIENTO SEROLOGICO

Aplicando la técnica de IDD descrita en el apéndice 4.2, los antígenos somáticos mucoráceos obtenidos fueron probados con el suero del paciente. Para ello la concentración de antígenos utilizada fué de 2 mg/ml colocándose en los pozos del centro de acuerdo al modelo de la fig. 2, con una serie de diluciones dobles del suero problema 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:64, 1:128, 1:256, 1:312, 1:624, 1:1248, se llenaron los pozos de la periferia incluyendo el suero concentrado. Otro modelo fué utilizado (ver fig. 4), en donde los pozos de la periferia contenían diluciones dobles de los antígenos somáticos a partir de la concentración de 2 mg/ml y en el pozo central se llenó con el suero concentrado. Los sueros hiperinmunes de los conejos se utilizaron como controles positivos.

El paciente fué tratado después del diagnóstico con Ketoconazol. Para seguir el curso de la resolución de la infección, varias muestras de sangre fueron colectadas durante el tratamiento: 3 semanas más tarde, 1 mes 11 días, 1 mes 18 días, 2 meses 12 días y 3 meses.

CUADRO 3.6

ESQUEMA DE INFECCION CON ESPORAS DE ZIGOMICETOS

DIA	DOSES	VIA
0	0.5 ml de Suspensión de esporas en solución salina fisiológica al 0.9%	IV
7	0.5 ml de Suspensión de esporas en solución salina fisiológica al 0.9%	IV
14	0.5 ml de Suspensión de esporas en solución salina fisiológica al 0.9%	IV
	Sangrar	
21	0.5 ml de Suspensión de esporas en solución salina fisiológica al 0.9%	IV
	Sangrar	
28	0.5 ml de Suspensión de esporas en solución salina fisiológica al 0.9%	IV
	Sangrar	
35	0.5 ml de Suspensión de esporas en solución salina fisiológica al 0.9%	IV
	Sangrar	
42	0.5 ml de Suspensión de esporas en solución salina fisiológica al 0.9%	IV
	Sangrar	
IV: Intravenosa		

IV.- RESULTADOS

1. ANALISIS DE LOS ANTIGENOS PRODUCIDOS

Los antígenos somáticos y metabólicos obtenidos de cepas de - Rhizopus arrhizus, Rhizopus rhizopodiformis, Absidia corymbifera, Absidia hyalospora y Mucor Subtilis fueron analizados en pruebas - de IDD y CIE con sueros hiperinmunes experimentalmente preparados en conejos específicos para las especies de hongos en cuestión, -- después de aparecer positiva la prueba de precipitación en tubo ca pilar.

Las lecturas de la IDD fueron realizadas después de 24 horas de haber llevado a cabo dichas pruebas, pero una lectura final tomada después del tratamiento con Citrato de Sodio y los posteriores lavados, secado y teñido. No se encontraron diferencias significativas entre ambas lecturas. Los resultados que aparecen aquí corresponden a la lectura final.

Cabe hacer notar que durante las pruebas de IDD con antígenos somáticos aparecía una línea más ancha y borrosa que tendía a desaparecer con Citrato de Sodio y los subsiguientes lavados, quedando únicamente las líneas más marcadas y definidas.

La concentración de antígeno más satisfactoria fué la de 2 -- mg/ml pues las líneas de precipitación se detectaron con más precisión, esto fué al ponerlos en contacto con sueros hiperinmunes concentrados.

Tanto en la IDD como en la CIE se observó que los antígenos - obtenidos de las diferentes cepas ya sea somáticos como metabólicos reaccionaron con sus antisueros específicos. Como se puede -- ver en las tablas 2 y 3, las reacciones cruzadas entre las espe-- cies resultó ser muy notoria, por lo tanto ningún antígeno especie específico fué encontrado.

En la prueba de IDD se observó sólo una reacción de precipita-- ción positiva, entre el antígeno somático de Mucor subtilis y su -- antisuero específico, no existiendo reacción cruzada con ningún -- otro antígeno; aunque en la prueba de CIE, con respecto a dicho an-- tígeno, se detectaron líneas de precipitación con casi todos los -- antisueros a excepción del obtenido contra el antígeno metabólico de Rhizopus arrhizus.

Como se muestra en la tabla 2, la reacción entre el antígeno somático de Rhizopus arrhizus y antisuero contra Ascidia curvibifera es mediante dos bandas perfectamente definidas. Así mismo en la tabla 3 se puede apreciar también lo anterior entre los antígenos somáticos de Rhizopus rhizodiferens y Ascidia hyalospora con el antisuero contra Ascidia hyalospora.

Las bandas formadas con los antígenos metabólicos se marca-- ron muy débilmente, en tanto que con los antígenos somáticos fue-- ron más definidas, por lo que las pruebas posteriores se trabaja-- ron únicamente con antígenos somáticos.

Ninguna banda de precipitación se formó al poner a reaccionar los antígenos de Aspergillus fumigatus y Candida albicans con todos los sueros hiperinmunes.

Tabla 2

RESULTADOS EN GEL INMUNODIFUSION DOBLE

ANTISUEROS	ANTIGENOS SOMATICOS				
	<u>Rhizopus</u> <u>rhizopodiformis</u>	<u>Rhizopus</u> <u>arrhizus</u>	<u>Absidia</u> <u>corymbifera</u>	<u>Absidia</u> <u>hyalospora</u>	<u>Mucor</u> <u>subtilis</u>
<u>R. rhizopodiformis</u> somático	+	+	+	+	+
<u>R. arrhizus</u> somático	+	+	+	+	-
<u>A. corymbifera</u> somático	+	++	+	-	-
<u>A. hyalospora</u> somático	+	+	+	++	-
<u>M. subtilis</u> somático	-	-	-	-	+
<u>R. rhizopodiformis</u> metabólico	+	+	+	+	+
<u>R. arrhizus</u> metabólico	+	+	+	+	-
<u>A. corymbifera</u> metabólico	+	+	+	+	+
<u>A. hyalospora</u> metabólico	-	+	+	+	-
<u>M. subtilis</u> metabólico	-	-	-	-	+

+ : una banda

++ : dos bandas

Cont. Tabla 2

RESULTADOS EN GEL DOBLE INMUNODIFUSION

ANTISUEROS	ANTIGENOS METABOLICOS				
	<u>Rhizopus</u>	<u>Rhizopus</u>	<u>Absidia</u>	<u>Absidia</u>	<u>Mucor</u>
	<u>rhizopodiformis</u>	<u>archizus</u>	<u>corymbifera</u>	<u>hyalospora</u>	<u>subtilis</u>
<u>R. rhizopodiformis</u> somático	†	†	†	†	†
<u>R. archizus</u> somático	†	†	†	†	-
<u>A. corymbifera</u> somático	†	†	†	†	†
<u>A. hyalospora</u> somático	†	†	†	†	-
<u>M. subtilis</u> somático	†	-	†	†	-
<u>R. rhizopodiformis</u> metabólico	†	-	†	†	-
<u>R. archizus</u> metabólico	†	†	†	†	-
<u>A. corymbifera</u> metabólico	†	-	†	†	†
<u>A. hyalospora</u> metabólico	†	-	†	†	-
<u>M. subtilis</u> metabólico	†	-	†	†	†

† : una banda

Tabla 3

RESULTADOS DE CONTRAINMUNELECTROFRESIS

ANTISUEROS	ANTIGENOS SOMATICOS				
	<u>Rhizopus</u> <u>rhizopodiformis</u>	<u>Rhizopus</u> <u>arrhizus</u>	<u>Absidia</u> <u>corymbifera</u>	<u>Absidia</u> <u>hyalospora</u>	<u>Mucor</u> <u>subtilis</u>
<u>R. rhizopodiformis</u> somático	†	†	†	†	†
<u>R. arrhizus</u> somático	†	†	-	†	-
<u>A. corymbifera</u> somático	†	††	†	-	†
<u>A. hyalospora</u> somático	††	††	†	††	†
<u>M. subtilis</u> somático	†	†	†	†	†
<u>R. rhizopodiformis</u> metabólico	†	†	†	†	†
<u>R. arrhizus</u> metabólico	†	†	†	†	†
<u>A. corymbifera</u> metabólico	†	†	†	†	†
<u>A. hyalospora</u> metabólico	†	†	†	†	†
<u>M. subtilis</u> metabólico	†	-	†	†	†

† : una banda †† : dos bandas

Cont. Tabla 3

ANTISUEROS	ANTIGENOS METABOLICOS				
	<u>Rhizopus</u> <u>rhizopodiformis</u>	<u>Rhizopus</u> <u>arrhizus</u>	<u>Absidia</u> <u>corymbifera</u>	<u>Absidia</u> <u>hyalospora</u>	<u>Mucor</u> <u>subtilis</u>
<u>R. rhizopodiformis</u> somático	†	†	†	†	-
<u>R. arrhizus</u> somático	†	†	-	-	-
<u>A. corymbifera</u> somático	†	-	†	-	-
<u>A. hyalospora</u> somático	†	†	†	††	-
<u>M. subtilis</u> somático	†	-	-	†	-
<u>R. rhizopodiformis</u> metabólico	†	-	-	-	-
<u>R. arrhizus</u> metabólico	†	†	†	-	-
<u>A. corymbifera</u> metabólico	†	-	†	-	-
<u>A. hyalospora</u> metabólico	†	†	†	†	-
<u>M. subtilis</u> metabólico	†	-	†	†	†

† : una banda

†† : dos bandas

2. RESULTADOS EN EL ESTUDIO DE LOS ANIMALES INFECTADOS CON AGENTES MUCORACEOS.

En cuanto a los animales infectados con suspensiones de esporas por vía intravenosa, no mostraron ningún decaimiento después de administrarse las dosis de inoculación.

Los sueros obtenidos cada 7 días después de la tercera inoculación se analizaron por prueba de IDO con los antígenos somáticos producidos, obteniendo los siguientes resultados resumidos en la tabla 4. Como se puede observar la cantidad de anticuerpos fué aumentado a medida que el número de inoculaciones era mayor, requiriendo antígeno más concentrado para la prueba de IDO.

Al cabo de tres semanas de iniciado la infección tanto los cultivos de los muestras de los diferentes órganos extraídos, así como los estudios histopatológicos de estos fueron negativos. Después de 2 meses no se detectó crecimiento de ninguna especie de hongo durante el examen de los cultivos, en cambio en el estudio histopatológico de los tejidos teñidos con Hematoxilina y Eosina se observó en cerebro numerosas hifas invadiendo el lumen de vasos sanguíneos, causando trombosis y existiendo acumulación perivascular de polimorfonucleares, también la inundación de células gigantes sobre crecimiento hifal fué visto. Las hifas de pared delgada de aproximadamente 200 milimicras de largo y 20 milimicras de ancho, se tiñeron perfectamente con Hematoxilina. Algunas hifas presentaban pocos septos y ramificaciones irregulares, los esterangios no se observaron, en ciertas áreas del órgano se hallaron infiltraciones celulares de neutrófilos con hifas micóticas degenera-

das con proyecciones esféricas. Con respecto a otros órganos el examen resultó negativo (Ver tabla 5).

3. CASO DEL PACIENTE SOSPECHOSO DE ZIGOMICOSIS.

Atendiendo a las lesiones que presentaba el paciente y considerando el hallazgo de hifas no septadas en la observación directa de las muestras, se utilizaron los antígenos Mucoraceos producidos siguiendo la técnica de IDD para el diagnóstico definitivo, ya que en los cultivos realizados como en el estudio histopatológico de las muestras tomadas no se halló ningún indicio de infección.

La prueba de IDD resultó positiva para el caso del suero del paciente sospechoso de zigomicosis. Se formaron bandas de precipitación entre el suero problema concentrado y los antígenos somáticos en concentración inicial 2 mg/ml de Rhizopus rhizopo diformis y Absidia hyalospora hasta la dilución 1:8 presentándose la zona de equivalencia entre el antígeno dilución 1:1 y el suero concentrado. Bandas de identidad se formaron con los sueros controles positivos contra las mismas especies de mucoraceos. Las dos bandas formadas entre el suero control positivo contra el antígeno somático de Absidia hyalospora, también se encontraron en la misma forma en el suero problema con el mismo antígeno.

En las otras pruebas de laboratorio los resultados fueron los siguientes: Química sanguínea normal; Biometría Hemática normal a excepción de valores bajos en hemoglobina (10.5 gr%): se descartó la presencia de algún parásito o bacteria infectante por la obser-

yación microscópica y cultivos de biopsias de la lesión. Las pruebas serológicas de IDD y CIE con antígenos metabólicos de Aspergillus fumigatus y Candida albicans resultaron negativas.

El paciente recibió terapia con tabletas de Ketokonazol (200 mg) después de haber sido diagnosticado. Al cabo de 1 mes y 11 días la prueba de inmunodifusión resultó positiva, mostrando bandas de precipitación en la dilución de antígeno 1:2 hasta la dilución 1:16 resultando la zona de equivalencia en la dilución 1:4. En un intervalo de 1 mes 18 días de tratamiento las bandas de precipitación aparecieron en la dilución de antígeno 1:32 a la dilución 1:1024, la zona de equivalencia se encontró en la dilución 1:512. A los 2 meses 12 días de tratamiento la prueba de IDD fue negativa, resultado que se mantuvo en las subsecuentes muestras de suero, aún cuando el antígeno se diluyó hasta 1:60 000.

El paciente se fué restableciendo de sus lesiones a medida que el tiempo de tratamiento aumentaba, llegando a la remisión total en 2 meses 20 días aproximadamente.

TABLA 4

TITULOS DE ANTISUEROS OBTENIDOS DE CONEJOS INFECTADOS CON
CEPAS DE MUCORALES DESPUES DE SER INOCULADOS .

DIA	CONCENTRACION DE ANTIGENO SOMATICO	TITULO DE ANTISUERO PROMEDIO	PRUEBA SEROLOGICA
14	0.2 mg/ml	1 : 2	IDD
21	0.2 mg/ml	1 : 16	IDD
28	1.0 mg/ml	1 : 8	IDD
35	2.0 mg/ml	1 : 32	IDD
42	2.0 mg/ml	1 : 128	IDD
70	2.0 mg/ml	1 : 1024	IDD

IDD : Doble inmunodifusión en gel

TABLA 5

RESULTADOS DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO (TINCION HEMATOXILINA-
EOSINA) DE ORGANOS DE ANIMALES CON DOS MESES DE INFECCION.

HONGO INFECTANTE	ORGANOS AFECTADOS						
	RIÑON	HIGADO	BAZO	CEREBRO	ESTOMAGO	PULMON	MUSCULO
<u>R. arrhizus</u>	†	-	-	†	-	-	-
<u>R. rhizopodi formis</u>	-	-	-	†	-	-	-
<u>A. corymbifera</u>	†	-	-	†	-	-	-
<u>A. hyalospora</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>M. subtilis</u>	-	-	-	†	-	-	-

TABLA 6

TITULOS DE ANTIGENOS SOMATICOS MUCORACEOS EN ZONA DE EQUIVALENCIA CON SUERO CONCENTRADO DEL PACIENTE DURANTE EL TRATAMIENTO CONTRA LA ZIGOMICOSIS .

DURACION DE TRATAMIENTO (DIAS)	TITULO DE ANTIGENO SOMATICO MUCORACEO, CONCENTRACION INICIAL DE 2.0 mg/ml .
0	1 : 1
41	1 : 4
48	1 : 512
72	-
90	-

V.- DISCUSION

El método llevado a cabo para la obtención de los antígenos mucoráceos es simple y rápida, siempre y cuando se tenga buen cuidado en la asepsia durante el proceso, al mismo tiempo del conocimiento de ciertos detalles como lo es la seguridad de que se utilizaron cepas específicas bien clasificadas, el medio en que se inició su crecimiento, así como las bases de los diferentes tratamientos que se efectuaron a los cultivos micóticos para separar los extractos antigénicos.

La razón por que se obtuvieron tanto antígenos somáticos como metabólicos fué en primera instancia observar quienes eran más antigénicos y confirmar su especificidad para su posterior uso en un posible diagnóstico.

Para ello el protocolo de inmunización con los extractos antigénicos se procedió de la misma forma en los animales de experimentación teniendo evidencia que por este método se obtenían títulos elevados de anticuerpos, así como de alta especificidad. Esto fué comprobado al realizar las pruebas de IDD y CIE, escogiéndose estas pruebas serológicas por tener ciertas ventajas como lo es la facilidad de identificar cada sistema antígeno-anticuerpo, la posibilidad de localizar por separado a los antígenos y anticuerpos e identificarlos entre sí, y el requerimiento de material no muy costoso para su realización; es bien sabido que estas pruebas se basan en la formación de un precipitado cuando un anticuerpo se combina con un antígeno soluble, esta característica la reúnen los antígenos mucoráceos producidos. (5, 8, 10).

La literatura existente sobre reportos de serodiagnóstico para zigomicosis es muy escasa, aunque todos ellos coinciden en que fueron realizados con los antígenos Mucoraceos producidos por Jones y Kaufman (22), en donde aparecen varias bandas de precipitación con cada uno de los antígenos, mientras que solo una línea de precipitación fué detectada en cada uno de ellos, haciendo notar que aunque fueron varias bandas de precipitación las resultantes en los reportes mencionados, presentaban reacciones de identidad entre las especies micóticas, situación similar observada en nuestro trabajo, por lo que podemos decir que todos los agentes Mucoraceos estudiados aquí comparten varias fracciones antigénicas. Quizas la presencia de las bandas múltiples en un sistema simple se halla debido a dos causas; concentración excesiva de antígeno o bien fracciones de diferente peso molecular para el mismo antígeno.

Debido a que no se observó una especificidad marcada del antígeno solo para su antisuero correspondiente se deduce que para llegar a un diagnóstico hasta especie del agente mucoral causante de la enfermedad, es necesario purificar aún más los antígenos producidos para el aislamiento de las fracciones específicas de cada especie.

Cabe destacar que solo el antígeno somático de Mucor subtilis no comparte fracción antigénica común a todas las demás especies, en cuanto al extracto antigénico de Absidia hyalospora presenta dos determinantes antigénicos en donde uno es similar a los demás zigomigetos estudiados en el presente trabajo. Por lo tanto es de esperarse que si resultaron reacciones de precipitación en un caso sospechoso de zigomicosis con cualquiera de estos extractos antigénicos, el

diagnóstico sería dado hasta la especie infectante, a reserva que -- otras especies de Mucorales faltan por probar.

La aparición de la línea ancha y borrosa en los geles en que -- difundieron los antígenos somáticos probablemente sean debidas al po lisacárido de la pared celular del hongo (39).

Pueden aparecer reacciones de precipitación falsas por la pre-- sencia de sustancia C presente en los extractos, la que podría reac-- cionar con la proteína C reactiva presente en el suero en determina-- do momento, esta interferencia se pudo eliminar con el tratamiento -- de Citrato de Sodio a las placas de agar, pues se sabe que esta re-- acción es dependiente de Calcio.

Al detectar bandas de precipitación trabajando con diluciones -- ya sea de antígeno o de anticuerpo, las cuales no desaparecían con -- los lavados, siendo menos susceptibles a la temperatura y concentra-- ción de algunos de los reactantes, cabe pensar en que la naturaleza -- de los anticuerpos sea de características precipitantes, esto tiene -- importancia por el hecho de que las bandas de precipitación serán vi sibles aunque el antígeno se encuentre en cantidades abundantes o en -- trazas, siempre y cuando existan anticuerpos. La posible limitación -- que pudiera existir al respecto es la falla para detectar anticuer-- pos no precipitantes.

La infecciones por hongos oportunistas que más frecuentemente -- ocurren son causadas por formas miceliales, así tenemos a la asper-- gilosis y zigomicosis, también se contará a la candidiasis, que pue-- den presentarse en una variedad de formas clinicopatológicas depen-- dientes de factores predisponentes como: exposiciones repetidas a --

rayos X, tratamientos con drogas citotóxicas o corticoesteroides, -- antibióticos y por complicación con alguna otra enfermedad como anemia aplásica, algunas variedades de leucemia, diabetes mellitus, -- amibiasis, cáncer, etc. (19, 26, 40), en donde las respuestas de defensa humoral y celular son muy bajas. Aspectos de la patología de tales infecciones tienen mucho en común, como es la presentación de lesiones necróticas y oclusión vascular e invasión de tejidos pulmonares. Aunque existen ciertas diferencias como el hecho de que la zigomicosis no es conocida como una infección que se presente en forma benigna, crónica o no progresiva en casos frecuentes, como es la asporgilosis. Por tal motivo se pensó en probar los extractos antigénicos producidos con los antígenos de Aspergillus y Candida, para determinar una posible similitud antigénica, y de tal suerte que no apareciera ninguna reacción cruzada entre ellos, entonces si descartar la posibilidad de que en cierto momento se diera un resultado falso en la interpretación de la prueba de un caso clínico. Es conveniente incluir que se ha observado la asociación de candidiasis y asporgilosis a ésta infección en pacientes graves. (40, 42)

La especificidad de los extractos antigénicos al poner a reaccionar los sueros hiperinmunes con otros tipos de antígenos (Aspergillus fumigatus y Candida albicans), mostrando buena especificidad ya que ninguno de los antígenos mencionados formó bandas idénticas a aquellas identificadas con los antígenos Mucoraceas de referencias. Otras clases de hongos pudieron haber sido probados también, -- pero esto fué difícil ya que no se contaba con todos los antígenos micóticos. Otra opción sería, trabajar con sueros de pacientes con otras infecciones micóticas establecidas diferentes de zigomicosis,

sin embargo ninguno de esos sueros tenemos en disponibilidad. Algo más fácil de realizar sería la infección de animales de experimentación con cepas de distintos hongos, lo cual es muy costoso, además hay que tomar en cuenta la susceptibilidad de los animales a contraer la infección. Más aún consideraremos las apreciaciones de Jones y Kaufman quienes trabajaron con sueros de pacientes con diversas micosis, probando sus antígenos Mucoraceos, no mostrando bandas de identidad con sueros provenientes de casos de blastomicosis, coccidioidomicosis, criptococosis, histoplasmosis, nocardiasis, paracoccidioidomicosis y esporotricosis, (22)

Con respecto a los resultados obtenidos en los animales de experimentación infectados con cepas de zigomicetos, tomando en consideración el tiempo para el desarrollo de la infección, la ausencia de algún signo de crecimiento micótico y la presencia de numerosos leucocitos y células gigantes multinucleadas en la lesión, sugiere la idea de una infección en un animal con un elevado grado de inmunidad adquirida por inoculación intravenosa con dosis subletal de esporas. El hecho de no hallar crecimiento en los cultivos de los órganos cabe pensar que la respuesta inmune a vencido la infección inicial, esto es comprobado al realizar las diferentes pruebas de IDD con los sueros colectados cada 7 días después de la tercera inoculación de esporas y los antígenos producidos, cuyos resultados revelaron elevación de títulos de anticuerpos conforme aumentaba el tiempo de infección (Ver tabla 4).

Paradójicamente, mientras las enfermedades contagiosas transmisibles de persona a persona, por vectores o por condiciones insalubres, han sido controladas hasta cierto punto por medidas higiénicas

adecuadas, las enfermedades infecciosas debidas a microorganismos -- saprófitos, comensales, o simplemente no patógenos en condiciones -- normales, se han elevado en forma muy considerable. Es bien sabido que un adulto sano tiene un elevado nivel de inmunidad natural para infecciones micóticas, no así el que presenta alguna alteración orgánica, quienes son presa fácil para los organismos oportunistas, tal es el caso presentado en este trabajo del paciente que presentaba -- anemia según los reportes de laboratorio, en quien se desarrolló una infección severa en mano y brazo, sugiriendo a los zigomicetos como agentes etiológicos según las características prevaletientes, reforzándose esto con la apreciación de hifas no septadas en el examen -- microscópico directo de la muestra de la lesión.

El curso de la zigomicosis subcutánea es benigna, sus lesiones -- son confinadas a tejido subcutáneo, pero su extensión degenerativa -- hasta involucrar vasos sanguíneos es ocasionada por falla en la resistencia inmune del paciente debido a circunstancias predisponentes; en el presente caso, la lesión se extendió en primer lugar por la negligencia a ser tratada, ya que ésta se agravó, un tratamiento fué -- administrado sin previa búsqueda exhaustiva del agente causal provocando que el crecimiento micótico se desarrollara aún más, pues como se sabe su virulencia se incrementa por acción de antibióticos antimicrobianos, por ejemplo tetraciclinas.

Los cultivos y estudios histopatológicos de las muestras provenientes de diversos sitios infectados del paciente resultaron negativos quizás por una muestra mal tomada, este es el riesgo que se -- corre cuando el método común de laboratorio es empleado, pues para -- los diferentes tipos de infecciones bacterianas como micológicas se

requiere de un conocimiento presuntivo de la infección sospechosa -- Para que de esta manera las muestras sean convenientemente tomadas, como por ejemplo en nuestro caso había que tener en consideración -- que estos hongos tienden a invadir rápidamente vasos sanguíneos.

Anta tales evidencias, estudios de IDD se realizaron con el suero del paciente, demostrando formación de bandas de precipitación específicas para los antígenos somáticos de Rhizopus rhizopodiformis y Absidia hyalospora, hecho no explicable, pues como se había observado en el análisis antigénico en donde todos los antígenos Mucoraceae parecían coincidir en sus determinantes antigénicos, se podría haber esperado un resultado de reacciones de identidad del suero problema con todos los antígenos producidos, pero no fué así, por lo que se podría pensar en la posibilidad de encontrarse en el suero del paciente anticuerpos específicos para ciertos determinantes antigénicos en dichas especies, más esto se requiere comprobar con varias muestras clínicas para dar esta suposición como correcta, lo que implicaría decir que estos antígenos obtenidos por nosotros podrían servir en un preciso momento para identificar la especie Mucoraceae infectante, lo cual es descartado hasta el momento por los estudios de análisis antigénicos llevados a cabo.

Por otro lado, una disminución de anticuerpos en el suero del paciente después de iniciarse el tratamiento con Ketoconazol hasta la no detección de reacción de precipitación y compararla con la apariencia externa de las lesiones, las cuales iban en franca mejoría conforme aumentaba el tiempo del tratamiento, solo se puede explicar de la siguiente manera: la enfermedad estaba siendo controlada, a --

tal grado que la cantidad de anticuerpos ya no era necesario en un número mayor.

La terapia fué suspendida hasta la remisión total de la infección y al no detectar títulos de anticuerpos. Por lo tanto es propio tomar en cuenta que esta información puede ser valorable en la evaluación de un pronóstico y en la determinación de duración de tratamiento, esto será si antes no se observan reacciones secundarias del medicamento.

Un ensayo más sensible que la prueba de IDD fué probado también, así atendiendo a las ventajas que presenta la CIE como son: la obtención de resultados en un mínimo de tiempo (2 horas) y el requerimiento de pequeñas cantidades de reactantes comparando con la IDD, se obtienen los mismos resultados aunque en más tiempo (24 horas), teniendo la ventaja esta últimas de ser técnicamente más simples en su ejecución, y requerir menos material; por tal motivo la técnica mas factible a usarse para un examen de diagnóstico de rutina es la IDD que reúne las características necesarias para ello. Aunque existen métodos serológicos más sensibles, no hay evidencia actual que asegure que una sensibilidad incrementada tenga alguna ventaja diagnóstica (4, 19). Cierta es la necesidad de desarrollar métodos alternativos de diagnóstico inmunológico para zidomicosis en pacientes con deficiencias inmunes, pues hay que recordar que estos hongos son oportunistas, por lo que se consideraría la posibilidad del desarrollo de métodos para la producción de antisueros monoespecíficos murinos y utilizarlos en la detección del hongo infectante, siendo necesario estudios posteriores sobre la identificación y purifica-

ción de moléculas antigénicas.

Debe enfatizarse que esta prueba serológica como todas las --- existentes para la mayoría de las infecciones micóticas no son más que una ayuda para el diagnóstico, y los resultados deberán tomar - en cuenta otras evidencias entre las que se encuentran los datos -- clínicos y los hallazgos en los cultivos y estudios histopatológi-- cos si son posibles.

Pues bien el primer paso está dado, esperando que el desarrollo de inmunoensayos para los Mucorales se vea incrementado, como en -- otras micosis, para la detección de ellos en fase temprana de la in-- fección, y ya que no sea vista con temor alguna complicación micóti-- ga, no solo por ser difícil diagnosticar, sino también por el riesgo de tratar inadecuadamente.

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- La metodología utilizada permitió la obtención de antígenos somáticos y metabólicos de hongos pertenecientes a la familia Mucoraceae de la clase ficomicetos causantes de la infección denominada genéricamente zigomicosis.
- 2.- Los antígenos somáticos son más útiles para llevar a cabo estudios de Inmunodifusión, pues mostraron reacciones de precipitación más definidas que los antígenos metabólicos.
- 3.- Los anticuerpos contra estos antígenos son del tipo de precipitantes, característica importante, pues permite observar las bandas de precipitación aunque el antígeno se encuentre en cantidades abundantes o en trazas, permaneciendo visibles.
- 4.- La concentración óptima de los extractos antigénicos obtenidos para resultados más satisfactorios es de 2 mg/ml.
- 5.- Rhizopus arrizus, Rhizopus rhizopodiformis, Absidia hyalospora y Absidia corymbifera, zigomicetos aquí estudiados, comparten fracciones antigénicas solubles, ya que se observan reacciones inmunológicas de identidad entre sí.
- 6.- Para llegar a un diagnóstico hasta especie del agente causal de la enfermedad, es necesario purificar aún más los antígenos producidos para el aislamiento de la fracción específica de cada especie.
- 7.- Los antígenos somáticos de Mucor subtilis y Absidia hyalospora pueden tener valor diagnóstico al confirmar la sospecha de zigomicosis ocasionada por estas especies en particular.

- 8.- En caso de confirmar rápidamente una sospecha de zigomicosis,-- estos antígenos podrían servir como ayuda diagnóstica encontrándose aún con vida el paciente, si la sospecha es afirmativa, se tiene una base fundamentada para proceder al tratamiento adecuado y posiblemente ser restablecida la persona, como sucedió con el caso clínico presentado.
- 9.- También estos extractos antigénicos nos pueden servir de guía para la detección de que la enfermedad esta siendo controlada adecuadamente, así como para la determinación de duración de la terapia.
- 10.- Los antígenos producidos Mucoraceos no reaccionan cruzadamente con antígenos de Aspergillus fumigatus y Candida Albicans, ni con sueros controles sanos que en cierto momento podrían haberse detectado como reacción falsa positiva.
- 11.- Debido a que los resultados obtenidos tanto en la IDD como en CIE fueron similares, a pesar de que éste último método es más sensible, es más factible que un ensayo de diagnóstico de rutina se realice la IDD por el requerimiento de menos material no muy costoso, fácil en su ejecución y en su interpretación requiriendo solo el conocimiento de ciertas bases inmunológicas y de los posibles que podrían dar falsos positivos o falsos negativos.

B I B L I O G R A F I A

1. ABRAMSON, E., WILSON, D., ARKY, R. A. (1967). Rhinocerebral -- phycormycosis in association with diabetic ketoacidosis; report of two cases and a review of clinical and experimental experience with amphotericin B therapy. Ann. Intern. Med. 66, -- 735.
2. BAKER, R. D. and LIMARES, S. (1974). Prednisolone-induced mucormycosis in Rhesus monkeys. Sabouraudia, 12, 75-80.
3. FAUER, H., WALLACE, G. L., SHELDON, W. H. (1957). The effects of cortisone and chemical inflammation on experimental mucormycosis (*Rhizopus oryzae* infection). Yale J. Biol. Med. 27, -- 389-95.
4. BUCKEY, H. R., CALLAGHAN, F., DAVIES, R. R., DAWSON, CH. G., - EDWARDS, J., EVANS, E. G. V., FAUX, J. A., HOLLAND, K. T., -- ODDS, F. C. (1976). Serology of fungal infection and Farmer's Lung disease. A laboratory Manual. British Society for Mycopathology. Edited by E. G. V. Evans.
5. CAMPBELL, D. H., GARVEY, J. D., CREMER, N. E. (1970). Immunological Reactions. Methods in Immunology. Immunology a Laboratory Text for Instruction and Research. Part. II, pag. 28-39, 36-83, 235-267, 2^o Ed. W. B. Benjamin Inc. Publishers.

6. CAMPBELL, C. M., STUART, J. L., (1980). The Medical Mycology Handbook. A Wiley Medical Publication. John Wiley and Sons. New York, U.S.A.
7. CHANDLER, F. W., DVM PhD., KAPLAN, W. D. V. M. MPH, AJELLO, L. PhD. (1980). Zygomycosis. A color Atlas and Textbook - of the Histopathology of Fungic Diseases. Cap. 27, Pag. 122-27. Wolf Medical Publications, LTD. Wolf House, Londres.
8. CLAUSEN, J. (1969). Immunochemical Techniques for the identification and estimation of macromolecules. Laboratory Technique in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. I Part. III, York, T. B., York, E., North Holland Publishing Company.
9. COBEL, W. J. and EADES, D. T. (1978). Observations on the Localization of Absidia corymbifera in vivo. Sabouraudia, 16, 125-32.
10. CROWLE, A. J. (1961). Basic considerations in Immunodiffusion. Tests Dynamics of Immunodiffusion test. Immunodiffusion, Cap. II, III, V. Pag. 11-25, 37-86, 243-250. 2^o - 2^o ed. Academic Press.
11. DENNIS, J. E., RHODES, D. H., COONEY, D. J. ROBERTS, G. (1980) Nosocomial rhizopus infections (zygomycosis) in children. The Journal of Pediatrics, 96 (5), 824-28.

12. EADES, D. M., CORBEL, M. J. (1975). Metastatic subcutaneous zygomycosis following intravenous and intracerebral inoculation of Absidia corymbifera spores. Sabouraudia, 13, 200-203
13. ELDEB, T. D., BAKER, R. D. (1956). Pulmonary mucormycosis - in rabbits with alloxan diabetes. Arch. Pathol., 51, 159--68.
14. EMMONS, CH. W., BINFORD, CH. H., UTZ, V. F. (1970). The Phycomycoses Medical Mycology. Cap. 18, Pag. 230-35, 2^o Ed. Edited Lea & Febiger.
15. FENG, R. H. K., CONRADO, M. and CHIN, C. (1981). Susceptibility of Zygomycetes to human serum. Sabouraudia, 19, 11-15
16. GARCIA-RAMOS, E., ALONSO, V. P. y BRANDT, H. (1961). Estudios microbiológicos realizados en autopsias. Infecciones -- por hongos. Rev. Lab. Invest. (México), 4, 37-52
17. GILL, G. S. (1934). Production of antiserum for the serological identification of bloodmeals of arthropods. Transaction of the Royal Society in tropical Medicine and Hygiene. 78, - 233-34.
18. GONZALES-MENDOZA, A. (1970). Opportunistic Mycoses. International Symposium on mycoses. Pag. 39-44. Publication -- Scientific no. 205. Pan American Health Organization Washington, U.S.A.

19. GERDCH, M. A. (1974). Serodiagnosis of opportunistic myco--
ses. Pag. 147-152. In: J. E. Frier and H. Fiemar (Ed), --
Opportunistic Infections University Park Press, Baltimore, Md.
20. HAIM, S., BESTER, O. S., LICHTING, C., ERLIK, D., BARZILAI,
A. (1979). Rhinocerebral mucormycoses following kidney --
transplantation. Iner. J. Med. Sci., 6, 646-49.
21. HIPP, S. G., BERNE, D. S., TOMPKINS, V., DUCKLEY, H. R. --
(1970). Latex slide agglutination test for Serpentilla anti-
bodies. Sabouraudia, 8, 237-41.
22. JONES, K. W. and KAUFMAN, L. (1976). Development and eva-
luation of an immunodiffusion test for diagnosis of zygomycos-
ses (Mucormycoses): Preliminary report. J. Clin. Microbiol
7 (1), 97-103.
23. KAPLAN, R. E., PUERTA, A. J., CHITTY, S. J. (1981). Rhinocer-
ebral mucormycoses. West. J. Med. 135, 326-29.
24. LEHER, (1980). Mucormycoses. Ann. Int. Med. 93 (1), Part
1, 90-95.
25. LIGBY, O. H., ROSENGRUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.
(1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. -
J. Biol. Chem. 193, 265-75.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

69

26. MC NULTY, J. S. (1982). Rhinocerebral mucormycosis: Predisposing factors. Laryngoscope, 92, 1140-43.
27. MEYER, V. D. ARMSTRONG, D. (1973). Mucormycosis-changing status. CRC Crit. Rev. Lab. Sci., 4, 421-51.
28. NEGROMI, R., ELIAS, M. R., DIACCHI, G., CAMBERTH, R. (1976) Preparación y estudio de un antígeno celular de Paracoccidioides brasiliensis, útil para pruebas cutáneas. Sabouraudia, 12, 265-73.
29. NOTTERBUCK, H., SCHLEP, H. J. and MULL, M. (1974). Taxonomy and identification of mucormycetes causing fungi I. Synonymy of Absidia ramosa with A. cornuifera. Sabouraudia, 12, 64-74.
30. MCGUTHY, A. (1979). Immunologic and other Biologic assay. - Basic Exercises in Immunochimistry. A Laboratory Manual. 4 Cap. III. Pag. 211-13, 232-51. 2^o Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
31. OGUNDARE, V. W. (1981). Nutritional physiology of pathogenic species of thermophilic Rhizopus. Sabouraudia, 19, 179-85
32. BRINHARDT, D. J., LICATA, I., KAPLAN, W., AJELLO, L., CHANDLER F. W., ELLIS, J. J. (1981). Experimental cerebral mucormycosis in alloxan-diabetic rabbits: variation in virulence among Zygomycetes. Sabouraudia, 19, 245-55.

33. RICHARDSON, M. D., WHITE, L. O., WARREN, R. C. (1979). Detection of circulating antigen of Aspergillus fumigatus in sera of mice and rabbits by enzyme-linked immunosorbent assays. Mycopath. 67 (520), 83-88.
34. RODRIGUEZ-TRUJILLO, F., AHUMADA-PEDILLA, M., RAMIREZ RIVERA, L., SANCHEZ-CABRERA, J. M. (1970). Un caso de fomicosis de la cara con invasión en cavidad craneana. Patología, 8, - 107-178.
35. SANDLER, R., TALIGAN, G. S., KEENEY, K. G., LEVING, D. P. (1971). Successfully treated rhinocerebral rhizomycoses in well controlled diabetes. J. Engl. J. Med. 285, 1132-33.
36. SCHLEGER, H. J. y MILLER, E. (1971). Manual para identificación de Mucorales patógenos. ISHAM, 1-5.
37. SEGRETAI, G., DRUGUE, E., MARIAT, E. (1977). Fomicosis Mucormicosis. Diagnóstico del Laboratorio en Micología médica, Cap. VI. Pag. 95-97. Edit. Fourrier, S. A.
38. SIMSON, R. HOFFMAN, G. G., HARDING, H. B. (1964). Phycomycoses. Aerosp. Med. 35, 668-75.
39. SMITH, J. M. D. (1977). Counterimmunoelectrophoresis and opportunistic fungal infections. Mycopath. 60, 95-101.

40. ST. CLAIR, W. (1962). Histopathologic aspects of the pathogenesis of some opportunistic fungal infections, as exemplified in the pathology of aspergillosis and the phicomycetoses. Lab. Invest., 11, 1073-1090.
41. STANDARD, P. G. and KAUFMAN, L. (1976). Specific immunologic test for the rapid identification of members of the genus Mistoplasma. J. Clin. Microb., 3 (2), 191-99.
42. TAMAYO, R., CARRASCO, M., GARZA, M., R. V. (1976). Zigomicosis y candidosis rinocerebral, presentación de un caso. Sabouraudia, 14, 223-230.
43. WALDFORD, A. R., HALDE, C., VEDROS, N. A. (1982). Murine model of pulmonary mucormycosis in Cortisone-treated mice. Sabouraudia, 20, 217-224.
44. WALDFORD, A. R., HALDE, C., VEDROS, N. A. (1983). Immunodiffusion and complement fixation assay with from Mucormycotic-infected mice. Mycopathologia, 83, 157-60.
45. YANKEY, R., ABRAHAM, A. A. (1983). Serologic studies of a case of fatal craniofacial mucormycosis. Mycopathologia, 82 105-109.
46. YARZABAL, L. A., BIGUET, J., VAUCELLE, T., ANDRIEU, S., TORRES, J. M. DA LUZ, S., (1973). Análisis Inmunoquímico de extractos solubles de Parasaccidioides brasiliensis. Sabouraudia, 11, 80-89.

47. YARZABAL, L. A., DE ALBORNOZ, M. B., DE CABRAL, N. A., SANTIAGO, A. R. (1978). Specific double diffusion microtechnique - for the diagnostic of aspergillosis and paracoccidioidomycosis using monospecific antisera. *Sabouraudia*. 16, 55-52.

VIII. LISTA DE FIGURAS, CUADROS y TABLAS

No.		Págs.
1.	Clasificación de los principales géneros de la Familia Mucoracea en cuanto a su morfología colonial.	17-18
2.	Clasificación de Zigomicetos de acuerdo a sus características morfológicas más importantes.	19-22
3.	Clasificación de los principales zigomicetos en base a su crecimiento a diferentes temperaturas.	-23
4.	Diagrama del proceso de obtención de antígenos mucoráceos.	27
5.	Esquema de Inmunización en conejos.	29
6.	Diagrama básico de la inmunodifusión doble en gel de agarosa.	32
7.	Modelos de pozos para inmunodifusión doble en gel agar	32-34
8.	Modelo utilizado en contraelectroforesis	36
9.	Esquema de Infección con esporas de zigomicetos en animales de experimentación.	41
10.	Resultados en gel inmunodifusión doble.	44-45
11.	Resultados en contraelectroforesis.	46-47
12.	Títulos de antisueros obtenidos de conejos infectados con cepas de Mucorales después de ser inoculados.	51
13.	Resultados del estudio histopatológico (tinción Hematoxilina-Eosina) de órganos de animales con dos meses de infección.	52
14.	Títulos de antígenos somáticos mucoráceos en zona de equivalencia con suero concentrado del paciente durante el tratamiento contra zigomicosis.	53

ABREVIATURAS UTILIZADAS

SDA	Agar Sabouraud dextrosa
ADP	Agar dextrosa papa
PBS	Solución buffer de fosfatos
FCA	Adyuvante Completo de Freund
FIA	Adyuvante Incompleto de Freund
IDD	Doble Inmunodifusión
CIE	Contrainmunolectroforesis