

13
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PRUEBAS INMUNES EMPLEANDO ANTIGENOS
FUNGICOS EN PACIENTES CON
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LETICIA CONCEPCION ARJONA ROSADO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	Pags.
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES -----	1
Planteamiento del problema -----	14
Hipótesis -----	15
Objetivos -----	16
MATERIALES Y METODOS -----	17
A. Población estudiada -----	17
B. Hongos -----	17
C. Medios de cultivo -----	18
D. Obtención de antígenos -----	19
E. Pruebas inmunológicas -----	21
RESULTADOS -----	25
DISCUSION Y CONCLUSIONES -----	31
LISTA DE TABLAS -----	40
BIBLIOGRAFIA -----	41

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Los hongos de las micosis profundas se caracterizan por producir un cuadro primario pulmonar a partir del cual pueden diseminarse a diferentes tejidos del cuerpo (9). Entre las micosis profundas están la histoplasmosis, la coccidioidomicosis, la paracoccidioidomicosis y la blastomicosis norteamericana. Los agentes etiológicos que causan estas micosis se encuentran en la naturaleza, en materia orgánica o en el suelo y están restringidos a hábitats característicos debido a sus requerimientos específicos. El mecanismo de infección es a través de la inhalación de esporas. En la naturaleza, estos hongos crecen como saprófitos, produciendo conidios y micelio; cuando estas estructuras son inhaladas por el hombre u otros animales, los organismos son capaces de adaptarse y crecer en el hospedero, ocurriendo cambios en su metabolismo y exhibiendo una transición morfológica: de una forma saprofítica a una forma parasitaria. La histoplasmosis generalmente se queda localizada en pulmón, la coccidioidomicosis puede diseminarse a piel, la paracoccidioidomicosis se disemina sobretodo a la mucosa bucal, nasal y ocasionalmente a la gastrointestinal, y la blastomicosis puede diseminarse a otros sitios del cuerpo, particularmente piel y hueso. La mayoría de las personas no desarrollan síntomas produciéndose una infección asintomática, pero cuando se desarrolla la enfermedad pueden producirse cuadros severos. En algunos individuos que padecen una infección crónica o residual, se produce una inflamación de tipo

granulomatoso lo que hace el cuadro parecido a la tuberculosis (54,8).

Histoplasma capsulatum es el agente etiológico de la histoplasmosis. Este hongo tiene la característica de ser un parásito facultativo intracelular del sistema fagocítico mononuclear del hospedero, donde se encuentra en forma de levadura de 2 a 4 µm de diámetro. En su fase de vida libre micelial, se encuentra en forma de macroconidios equinulados y está siempre asociado a suelos ricos en nitrógeno y fósforo, como son lugares con excretas de aves y guano de murciélago (cuevas, grutas, minas abandonadas, graneros y silos) (54,68). La histoplasmosis es la micosis sistémica más importante en el mundo y la de mayor trascendencia en el continente americano, en particular en México (66). Se conoce a la histoplasmosis pulmonar primaria de nuestro país, como una de las micosis con mayor tasa de letalidad en el mundo (70). Aunque se tienen datos de la existencia de brotes epidémicos en todos los estados del país, con excepción de Tlaxcala, los que presentan mayor frecuencia son aquellos que debido a la estructura geológica de su suelo, poseen mayor número de cavernas y/o minas abandonadas: Guerrero, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Morelos, Chiapas y Península de Yucatán (20,71).

La coccidioidomicosis es producida por Coccidioides immitis, hongo que en su fase infectante presenta artroconidios asociados a un ambiente semiárido. Al penetrar a través de las vías respi-

ratorias del hospedero, se transforma en células redondas, que evolucionan hasta convertirse en esferulas, que al madurar y romperse, liberan endoesporas las que individualmente pueden completar el ciclo, hasta llegar a esferulas otra vez (17). Las esferulas pueden llegar a medir de 40 a 80 µm de diámetro. Este hongo está considerado como el más virulento de los hongos patógenos para el hombre (54). Se aísla con frecuencia de suelos que contienen alta concentración de sales, particularmente sulfato de calcio y boratos, así como el que contiene materia orgánica carbonizada. Entre las áreas endémicas de esta enfermedad se encuentra el suroeste de los Estados Unidos (Valle de San Joaquín). Asimismo, más de la mitad del territorio mexicano repartido en tres zonas: la zona I que comprende a los estados que limitan con Estados Unidos, la zona II que comprende los estados de la comarca lagunera y la zona III que comprende los estados de Sinaloa, Nayarit y Colima y dos microáreas tropicales en Apatzingán, Michoacán y el Valle de Arcelia en Guerrero (18,69).

La paracoccidioidomicosis es causada por Paracoccidioides brasiliensis. La forma micelial infectante de este hongo es muy similar a los conidios de Blastomyces dermatitidis. Al penetrar al hospedero toma la forma de levaduras multigermantes (limón de barco) típica de P. brasiliensis. Hasta ahora el hábitat saprobio característico y las asociaciones ecológicas del hongo no están completamente claras. No obstante, estudios recientes de pruebas cutáneas en poblaciones y el aislamiento del organismo del suelo ha comenzado a clarificar la ecología y la epidemiología de la

enfermedad (54). Las infecciones en humanos con P. brasiliensis son observadas en las regiones tropicales y subtropicales (zonas boscosas y húmedas) de latinoamérica, desde México hasta Argentina (principalmente Brasil, Venezuela, Colombia y Guatemala) (50). Velasco Castrejón en 1981 (67), mediante estudios epidemiológicos logró reunir 56 casos de diez estados de la República Mexicana. La mayoría de los pacientes provenían del estado de Veracruz y las Huastecas.

Otra de las enfermedades producidas por estos hongos es la blastomicosis norteamericana, cuyo agente etiológico es B. dermatitidis. Las aleuriosporas ovoides de 2 a 10 μm de diámetro encontradas en la fase micelial, son los elementos infectantes que al penetrar al hombre se transforman en levaduras de 8 a 20 μm de diámetro con un característico septo ancho de gemación simple. El hábitat preciso de B. dermatitidis es desconocido. La blastomicosis ha estado restringida geográficamente a los Estados Unidos de América donde es bastante frecuente (54,11). En México, esta infección es rara, con un solo caso informado en la literatura (40), importado aparentemente de E.U.A.

En lo que se refiere a otras micosis que pueden afectar al sistema respiratorio se encuentran las micosis oportunistas (candidiasis, aspergilosis, criptococosis, mucormicosis) que son detectadas cada vez con mayor frecuencia en pacientes debilitados por diversas afecciones (69). La esporotricosis, micosis subcutánea, también puede producir un cuadro pulmonar, al

penetrar el agente etiológico por vías respiratorias.

La aspergilosis es una enfermedad causada por diferentes especies del género *Aspergillus*; es un hongo común en el medio ambiente y se puede aislar de cualquier tipo de suelo así como de todo resto orgánico. Este hongo no es dimórfico y la forma infectante consistente de micelio con conidios producidos en conidióforos es la misma que puede observarse en las muestras biológicas provenientes de pacientes con la enfermedad. En estas muestras se pueden observar hifas de 2.5 a 4.5 μm de diámetro así como los conidióforos con conidios característicos. La enfermedad producida por este género presenta una gran diversidad de procesos patológicos, entre los que se encuentran principalmente la aspergilosis pulmonar (alérgica, aspergiloma, invasiva) y la diseminada (54). El tipo de enfermedad que se produce depende del estado general del hospedero. La especie que más frecuentemente afecta al hombre es *Aspergillus fumigatus*, y en menor frecuencia: *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. clavatus* (54,16).

La candidiasis es una infección primaria que incluye a especies del género *Candida*; se considera como una micosis frecuente y de distribución mundial. *Candida albicans* es el agente etiológico encontrado en la mayoría de las formas clínicas de esta enfermedad. Es una levadura ovoide a veces elongada que mide de 4 a 10 μm de diámetro y se reproduce por gemación. En condiciones adecuadas a 37°C puede formar pseudomicelio "in vitro". En su estado de comensal en el hospedero presenta formas de levaduras y en su estado parasitario se presenta como micelio.

considerándose un hongo dimórfico (57). Debe señalarse que Candida es un saprofito normal del organismo en orofaringe, intestino, piel y vagina, lo cual facilita su localización en los epitelios. Debido a factores de oportunismo en el hombre, Candida puede producir una gran diversidad de cuadros clínicos que van desde simples candidiasis cutáneas hasta cuadros severos de candidiasis sistémica con manifestaciones de enfermedad pulmonar (16).

La esporotricosis es una micosis subcutánea producida por Sporothrix schenckii que afecta al hombre y animales, de evolución crónica o subaguda, que ataca piel y tejido subcutáneo. Asimismo, puede afectar hueso, mucosas y sistema nervioso central en su forma diseminada (54). Al penetrar al organismo se transforma a su estado parasitario o levaduriforme (13), siendo así un hongo dimórfico. La forma micelial se encuentra en el suelo y material vegetal y presenta hifas septadas de 1 a 2 μm de diámetro, conidios piriformes, ovales o elongados de 1.5 a 3 μm que son producidos en forma de simpodio dando lugar a las margaritas típicas de este hongo. La fase levaduriforme o parasitaria consta de células fusiformes u ovoides de 2.5 a 5 por 3.5 a 6.5 μm y se reproduce por gemación simple o múltiple (39). La esporotricosis es una micosis cosmopolita. En el continente americano se encuentra principalmente en América del Sur y Centroamérica. En México, es un padecimiento que ocupa los primeros lugares entre las micosis subcutáneas (34). Además de los cuadros clínicos típicos de esta enfermedad, se reconocen casos pulmonares adquiridos por vía respiratoria, los cuales son muy difíciles de

diagnosticar ya que se puede confundir fácilmente con otras afecciones pulmonares, sobretodo en individuos con deficiencias en el sistema inmune (33,41).

Debido a la alta incidencia de algunas micosis en México, especialmente histoplasmosis, coccidioidomicosis y candidiasis, y teniendo en cuenta la frecuencia de casos nuevos y la gravedad de estas enfermedades pulmonares, sobretodo en condiciones de mala nutrición o en clases socioeconómicas bajas, así como en los estados inmunosupresivos del hospedero, es fundamental el diagnóstico preciso y temprano de estas enfermedades. Desde que se reconoció el valor fundamental de las pruebas inmunológicas para el diagnóstico y pronóstico de estas micosis se han venido aislando diversas fracciones antigénicas para su utilización en estas pruebas. Diversos autores han tratado de identificar, aislar y caracterizar los antígenos específicos de los hongos causantes de las micosis profundas.

Heiner en 1958 (24), por medio de la técnica de inmunodifusión identificó en filtrados de cultivo de H. capsulatum, denominado histoplasmina, dos bandas específicas de precipitación que denominó H y M. Bradley y cols. (5) lograron purificar y separar estos antígenos de la histoplasmina a través de la cromatografía en columna, pero a pesar de la purificación, estos antígenos contenían fracciones comunes. Con el objeto de obtener antígenos suficientemente específicos y sensibles, se han venido realizando diversas investigaciones sobre este tema (51,59,60,62). Entre ellas Taylor y cols. (59) en un estudio

sobre H. capsulatum aislaron un complejo polisacárido-proteína (CPP) con buena especificidad en inmunodifusión en gel, observando que por la acción de la enzima β -glucosidasa hubo pérdida de la actividad antigenica, en tanto que con calor y una enzima proteolítica (pronasa), no se alteró la actividad del antígeno. En otro trabajo del mismo autor (60), se determinó la respuesta mediada por células en ratones inmunizados con H. capsulatum y C. immitis utilizando el complejo polisacárido-proteína (CPP) y una fracción desproteínizada del complejo (CPP-D). En el ensayo del cojinete plantar, la histoplasmina y coccidioidina (antígenos crudos) presentaron reacción cruzada en los animales sensibilizados, pero al utilizar el CPP y el CPP-D de H. capsulatum se obtuvo respuesta solamente en los animales sensibilizados con el hongo homólogo respectivo. En fecha reciente se están utilizando anticuerpos monoclonales en la purificación de antígenos (30).

Las pruebas serológicas para determinar anticuerpos contra C. immitis han asumido un importante papel en el diagnóstico y pronóstico de la coccidioidomicosis. Anticuerpos contra antígenos miceliales (coccidioidina) y contra antígenos de la fase esférula-endoespora (esferulina), han sido observados en fluidos corporales usando una variedad de pruebas inmunológicas (45). Huppert y cols. (25), haciendo un análisis antigénico de la coccidioidina y esferrulina por inmunoelectroforesis bidimensional, encontraron 26 antígenos, de los cuales 10 eran comunes a ambos y dos presentes solamente en la esferrulina, a los que

denominó A y B; más tarde con la misma técnica (26), identificó antígenos compartidos entre los hongos que producen micosis profundas usando un sistema de referencia coccidioidina-anticoccidioidina, encontrando 10 y 12 antígenos comunes en preparaciones de H.capsulatum y B.dermatitidis respectivamente. Ward y cols. (73) prepararon un antígeno soluble en agua y en alcali de C.immitis, el cual funcionó bien en las pruebas serológicas, a pesar que las reacciones cruzadas con H.capsulatum y B.dermatitidis fueron evidentes. Kaufman y Standard (32) encontraron exoantígenos específicos de C.immitis a los que denominaron HS, HL y F en inmunodifusión, los cuales no presentaron cruce antigénico en esta prueba.

En P.brasiliensis, Yarzabal y cols. (74) aislaron un extracto antigénico, el cual probaron por Ouchterlony, observando dos bandas que denominaron E-1 y E-2, demostrando la primera, actividad de fosfatasa alcalina. Estudios posteriores realizados con la banda E-2 comprobaron su especificidad para P.brasiliensis, ya que reaccionó únicamente con sueros de pacientes paracoccidioidomicosos (75). El mismo autor determinó la localización subcelular del antígeno E-2 en la fase levaduriforme, mediante estudios inmunoenzimáticos y de microscopía electrónica (76). Por otra parte Restrepo y Moncada (49) en un estudio sobre la caracterización de antígenos de este mismo hongo, utilizando la técnica de Ouchterlony, obtuvieron tres bandas de precipitación donde observaron que la banda 1 era similar al antígeno E-2 obtenido por Yarzabal y que la banda 3 presentaba reacción cruzada con el antígeno M de H.capsulatum. En estudios posteriores, Puccia y

cols. (47) obtuvieron una glicoproteína de 43 KD específica de P.brasiliensis, denominada Gp-43. Esta presentó una banda con la misma migración electroforética que el antígeno E de Yarzábal; no obstante, su producción es baja y su obtención depende de la cepa, medio de cultivo y tiempo de incubación. Posteriormente (58), demostraron que la Gp-43 puede ser precipitada específicamente por sueros de pacientes paracoccidioidomicosos y que es continuamente producida en pequeñas cantidades y secretada en el medio por las levaduras que están en crecimiento activo, por lo que los cultivos en fase exponencial de crecimiento serían los adecuados para una producción máxima de este antígeno exocelular.

En lo que se refiere a B.dermatitidis, Kaufman obtuvo de filtrado de cultivo de la fase levaduriforme dos bandas por inmunodifusión que denominó A y B (31). Usando cromatografía de intercambio iónico, Green (22), purificó una fracción de B.dermatitidis que presentó una banda A en Ouchterlony; sin embargo al ensayarlo con sueros de pacientes en inmunodifusión, solamente el 52% fue positivo en casos comprobados de blastomicosis y el 20% presentó reacción cruzada con otras enfermedades fúngicas. Cox (9) describió un antígeno de la pared celular de la fase levaduriforme de B.dermatitidis soluble en álcali y en agua. sin embargo, en este no encontró el antígeno A descrito por Kaufman. Este antígeno pudo diferenciar a cobayos sensibilizados con B.dermatitidis de los sensibilizados con H.capsulatum.

Por otro lado, la considerable variación antigénica de Aspergillus spp se ha podido demostrar a través de diferentes

trabajos sobre estos hongos; la aspergilina es obtenida por concentración del filtrado de cultivo o por rompimiento mecánico del micelio (37,38). En estos hongos, existe además un componente que promueve con frecuencia un diagnóstico erróneo, que consiste en un polisacárido somático conocido como sustancia C. Este componente se acumula en medios de cultivo viejos de 6 semanas o más de incubación, así como en micelio de algunos cultivos jóvenes. La sustancia C reacciona con cualquier suero que contenga proteína-C-reactiva (35). También se ha estudiado la naturaleza enzimática de los principales componentes antigénicos de *Aspergillus spp.*, mostrando que dos precipitinógenos, designados C y J, tienen características de catalasa y quimi tripsina respectivamente, y aparecen en los sueros de los pacientes con aspergilosis (64). Pérez Mejía y Toriello (46) al trabajar con antígenos metabólicos, polisacáridicos y somáticos de *A.fumigatus*, *A.flavus* y *A.niger*, encontraron que la mayor actividad serológica y menor cruce inmune se presentaba en los antígenos citoplásmicos, los cuales también presentaron la actividad de la catalasa.

Las células de *Candida* producen un amplio rango de antígenos, pero los dos tipos principales son: proteínas derivadas del citoplasma celular y polisacáridos de la pared celular (mananas). Axelsen (2) demostró 78 antígenos solubles asociados con el blastoconidio de *C.albicans*. En la literatura se han informado de un gran número de estudios inmunológicos y antigénicos sobre *Candida* en sueros de sujetos sanos e infectados (48); la composición química de los antígenos utilizados generalmente no está

bien definida y sus concentraciones en las pruebas muestran gran variabilidad. Por la diversidad de las metodologías utilizadas en la obtención de las preparaciones antigénicas es muy difícil hacer comparaciones de los resultados de diferentes centros. Recientemente Casanova y cols. (7) obtuvieron un anticuerpo monoclonal contra una manoproteína (260 Kd) de la pared del micelio de C. albicans que promete como antígeno específico de este hongo. Desafortunadamente, el diagnóstico de esta infección fúngica sigue siendo complicado por lo que el resultado positivo de las pruebas serológicas para poder dar el tratamiento adecuado, ocurre solo en un 15-40% de los pacientes con candidiasis invasiva (14,48).

Entre los antígenos empleados para el diagnóstico de la esporotricosis se encuentran los concentrados de filtrado de cultivo, células completas, paredes celulares y fracciones polisacáridicas (1,17,21,38). Entre los diferentes azúcares que constituyen el polisacárido de S. schenckii se encuentra la ramnosa, azúcar que no ha sido detectado en otras entidades fúngicas patógenas, lo que le confiere especificidad (61). Travassos (65) obtuvo la estructura química de antígenos de S. schenckii, la cual es una monoramnosil ramnomanana para las levaduras y conidios y diramnosil ramnomanana para el micelio. Las esporotricinas (antígenos metabólicos de S. schenckii) son ampliamente utilizadas en pruebas intradérmicas como apoyo diagnóstico, ya que esta micosis produce una hipersensibilidad tardía específica en individuos infectados (17,21,34,61), así como en pruebas de inmunodifusión y aglutinación para los casos de esporotricosis

diseminada y pulmonar. Arenas y Toriello (1) realizaron un estudio sobre las condiciones óptimas para la obtención de antígenos metabólicos, de las formas micelial y levaduriforme, y el efecto que tiene la fase de crecimiento de *S. schenckii* en la actividad inmunológica. Los mejores resultados en inmunodifusión y contraelectroforesis los obtuvieron con los antígenos derivados del final de la fase logarítmica de crecimiento del hongo.

Considerando la reactividad cruzada demostrada por diversos autores, sobretodo en los hongos causantes de micosis profundas, algunos investigadores se han orientado a estudiar las unidades de cruce con el fin de eliminarlas o bloquearlas. Azuma y cols. (3) identificaron galactomananas compartidas por *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*. Ishizaki y cols. (28) identificaron un residuo D-galactosil como el responsable de la reacción cruzada entre *S. schenckii* y algunos hongos no relacionados. Jiménez Montiel y cols. (29) al tratar de eliminar el cruce inmune de antígenos polisacáridos-protéicos (CPP-D's) en *H. capsulatum*, *C. immitis* y *P. brasiliensis* con las enzimas α y β -galactosidasas, encontraron que la unidad de cruce importante no es debida a residuos no reductores de galactosa, y que estos CPP-D's contienen galactosa unida por enlaces β . Sin embargo, estos CPP-D's han demostrado un menor cruce inmune al utilizarlos en inmunodifusión en gel, hemaglutinación y fijación de complemento (51,59,60).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios sobre antígenos fúngicos ponen de manifiesto que a pesar de que en algunos casos se ha adquirido un antígeno específico, éste es obtenido después de métodos muy laboriosos y costosos que no están al alcance de todos los laboratorios de serodiagnóstico.

Teniendo en cuenta que la histoplasmosis es ya considerada en México una micosis importante en salud pública (71), además de que existen zonas endémicas de coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis en el país (67,69) y el frecuente diagnóstico de candidiasis en centros hospitalarios, consideramos importante además de profundizar el trabajo de investigación previo por Becerril y cols. (4), crear nuevos criterios y ampliar los conocimientos sobre la distribución, frecuencia y metodología que nos lleven a un mayor conocimiento de los problemas micóticos en el país, ya que en nuestro laboratorio se obtienen los antígenos para el diagnóstico y pronóstico de las micosis profundas y oportunistas. Es importante entonces probar la reactividad y especificidad de antígenos crudos y purificados en diferentes pruebas inmunológicas en una población de pacientes con enfermedades respiratorias, con el fin de caracterizar posibles asociaciones o antecedentes de enfermedades micóticas, ya que muchas veces estos pacientes desarrollan infecciones concomitantes que dificultan la resolución del padecimiento.

HIPOTESIS

El diagnóstico de micosis profundas en una población de pacientes con enfermedades respiratorias pone en evidencia la presencia de zonas endémicas de estas micosis en el país.

La presencia de factores predisponentes en pacientes hospitalizados favorecen la aparición de micosis oportunistas.

OBJETIVOS

- 1.-Determinar la utilidad de los antígenos obtenidos en el laboratorio en pruebas inmunológicas de diagnóstico y pronóstico.
- 2.-Comparar la eficacia de antígenos crudos y purificados en ELISA.
- 3.-Estudiar la incidencia de las micosis profundas así como de oportunistas, en pacientes con enfermedades respiratorias.

MATERIALES Y METODOS

A) POBLACION ESTUDIADA.

El estudio fue realizado en 186 pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de México, siendo la mayoría de ellos clasificados con tuberculosis y los demás como enfermos pulmonares con afecciones respiratorias diversas. Se tomó, a cada paciente, 10 ml de sangre periférica para obtención y separación de suero, el cual fue repartido en alícuotas conservadas a -45°C hasta su uso.

B) HONGOS.

Para obtener los antígenos se utilizaron cepas de hongos aisladas de casos humanos en México. Estas procedieron del cepario del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM, donde son mantenidas en agar Sabouraud (Bioxón) y/o micobiótico (Bioxón) a 26°C. Las cepas seleccionadas para este estudio fueron:

<u>Histoplasma capsulatum</u>	(EH-53)
<u>Coccidioides immitis</u>	(EH-45)
<u>Paracoccidioides brasiliensis</u>	(EH-55)
<u>Blastomyces dermatitidis</u>	(EH-42)
<u>Aspergillus fumigatus</u>	(EH-20)
<u>Candida albicans</u>	(EH-21)
<u>Sporothrix schenckii</u>	(EH-49)

C) MEDIOS DE CULTIVO.

Todos los medios utilizados en la obtención de antígenos fueron sintéticos o semisintéticos.

Medio de Smith (55). Para la obtención de los antígenos de H. capsulatum, C. immitis, F. brasiliensis, B. dermatitidis y A. fumigatus.

Citrato férrico anhidro	0.3g
Fosfato dibásico de potasio	1.31g
Citrato de sodio anhidro	0.4g
Sulfato de magnesio heptahidratado	1.5g
Dextrosa anhidra	10.0g
Glicerina	25.6 ml
Asparagina	14.0g
Cloruro de amonio	7.0g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml
pH 7.2 a 7.4	

Medio de Toriello y Mariat (61). Para la obtención del antígeno de Sporothrix schenckii.

Fosfato monobásico de potasio	0.6g
Fosfato dibásico de sodio	0.75g
Hidrolizado de caseína	3.0g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.5g
Cloruro de calcio	0.1g
Cloruro de sodio	0.1g
Glucosa	20.0g

Glicerol -----	10.0g
Extracto de levadura -----	1.0g
Tiamina -----	10 ⁻⁶ g/l
Solución oligodinámica de Berthelot -----	0.5 ml
Agua destilada c.b.p. -----	1000 ml
PH 6.5	

Medio de Czapek modificado. Para obtención del antígeno de
Candida albicans.

Extracto de levadura -----	10.0g
Glucosa -----	30.0g
Fosfato dibásico de potasio -----	1.0g
Sulfato de magnesio -----	0.5g
Cloruro de sodio -----	0.5g
Sulfato ferroso -----	0.01g
Agua destilada c.b.p. -----	1000 ml
PH 7.3	

D) OBTENCION DE ANTIGENOS.

La histoplasmina, coccidioidina, paracoccidioidina y blastomicina fueron obtenidas del cultivo en medio sintético de Smith (55) después de 3 meses de incubación a temperatura ambiente. Como el crecimiento de P. brasiliensis es pobre en este medio se hizo la siguiente modificación: se disolvieron 5 g de extracto de levadura y 5 g de peptona en 100 ml de agua destilada y se dializaron contra 1000 ml de agua destilada a 4°C durante 24 horas. El dializado fue utilizado como solvente para los compo-

nentes del medio. Al término de la incubación se identificó la morfología característica de cada hongo y se agregó a los cultivos una solución de timerosal 1/5000 (concentración final) durante una semana, seguido de una prueba de viabilidad de microorganismos. Se separó la masa micelial por medio de filtración en papel Whatman No. 3. El filtrado se pasó por membrana Millipore (0.45 μ m), se dializó y concentró 10 veces empleando un equipo de ultrafiltración Amicon modelo 8 400 equipado con una membrana FM 10. Estos antígenos crudos fueron purificados según la metodología descrita en Becerril y cols. (4). A 10 ml de filtrado se le agregaron 15 g de fenol líquido, se separó la fase acuosa, la cual se precipitó con etanol al 95%. Este precipitado fue desproteínizado con pronasa (15) a 37°C, durante 7 días y posteriormente por el reactivo de Sevag (cloroformo/butanol 9v/1v) (56). Se obtuvieron así, los antígenos purificados denominados complejos polisacárido-proteína desproteínizados (CPP-D) de H.capsulatum (CPP-D-histo), C.immitis (CPP-D-cocci), P.brasiliensis (CPP-D-paracocci) y B.dermatitidis (CPP-D-blasto).

La aspergilina fue obtenida del filtrado de cultivo de A.fumigatus, incubado a 30°C durante 20 días en medio de Smith. El filtrado se dializó y concentró 10 veces por ultrafiltración con el equipo y membrana Amicon arriba mencionados.

La esporotricina fue obtenida del filtrado de cultivo de Sporothrix schenckii, incubado a 26°C durante 3 meses en medio sintético de Toriello y Mariat (61). Se dializó y concentró por

Amicon de igual manera que los anteriores. Luego se procedió a su precipitación con alcohol al 90% y se secó por acetona en frío, según la metodología descrita por Arenas y Toriello (1).

La candidina fue obtenida de levaduras cultivadas a 37°C, durante 48 horas, en medio semisintético de Czapek modificado de la siguiente manera: 10 g de extracto de levadura se disolvieron en la cantidad mínima necesaria de agua destilada y se dializó contra 250 ml de agua destilada a 4°C durante 24 horas; el dializado fue utilizado como parte del solvente para los componentes del medio. Después de la incubación, las células fueron muertas con timerosal 1/5000 y lavadas 3 veces con solución salina estéril. Las levaduras se rompieron por medio del fraccionador RIBI a 40,000 psi, 3 veces por 5 segundos, hasta comprobar el 90-95% de lisis celular. Se procedió a una centrifugación de 2500 x g durante 5 minutos, según la metodología descrita por Becerril y cols.(4), para eliminar los restos celulares y el sobrenadante fue utilizado como antígeno.

A todos los antígenos crudos y CPP-D's se les determinaron proteínas por el método de Lowry y cols. (36) y carbohidratos por el método de Dubois y cols. (12).

E) PRUEBAS INMUNOLÓGICAS.

1) Intradermoreacción (IDR).

Para la prueba intradérmica se utilizaron los siguientes antígenos: histoplasmina, coccidioidina, paracoccidioidina, blastomicina, candidina y esporotricina. Estos se uniformaron a una

concentración aproximada de 10 µg de proteína/0.1 ml de solución salina isotónica estéril. Solamente la esporotricina fue utilizada a una dilución de 1/2000 que correspondió a 3.5 µg de proteína por 0.1 ml. Las pruebas se realizaron aplicando 0.1 ml del antígeno intradermicamente en la cara interna del antebrazo. Se leyó a las 24 y 48 horas, considerándose positiva la reacción, con un eritema e induración mayor o igual a 5 mm de diámetro. La intradermorreacción se aplicó 1 hora después de la toma de muestra sanguínea.

2) Inmunodifusión (ID).

La inmunodifusión de Ouchterlony (43) se realizó según la microtécnica de Palmer y cols. (44) con una solución de glicina (7.5% glicina, 0.9% cloruro de sodio, 0.4% citrato de sodio y 0.25% de fenol al 90% p/v), pH 6.3, con 1% de agar noble, utilizando una matriz que permite el procesamiento de 64 muestras séricas simultáneas.

3) Contrainmunolectroforesis (CIE).

La contraimunolectroforesis (44) se llevó a cabo con amortiguador de barbital, pH 8.6, 0.75 M, $\mu=0.075$ (2.76g ácido dietilbarbitúrico, 15.4g de barbital sódico y 0.065g de azida de sodio, agua destilada c.b.p. 1000 ml); para los gales soporte se agregó 1 g de agarosa a 99 ml de amortiguador. El corrimiento de las muestras se hizo aplicando una corriente constante de 20 mA por placa de 8.3 x 10.2 cm, durante 30 a 60 minutos según el antígeno. Para la aspergilina 30, para la candidina 45 y para la histoplasmina, coccidioidina, paracoccidioidina, blastomicina

y esporotricina 60 minutos.

4) Reacción de fijación de complemento (RFC).

La microfijación de complemento se llevó a cabo al 100% de hemólisis según la técnica de Habel y Salzman (23) modificada, la cual utiliza una solución amortiguadora de barbital (83.3g cloruro de sodio, 2.52g bicarbonato de sodio, 3g dietil-barbiturato de sodio, 4.6g ácido 5-5-dietilbarbitúrico, 1g cloruro de magnesio hidratado, 0.2 g cloruro de calcio hidratado, agua c.b.p. 2000 ml) a pH 7.3; eritrocitos de carnero al 2%, suero (complemento) de cobayo, hemolisina (MICROLAB) y antígenos crudos. Todos los componentes se titularon a dos unidades hemolíticas. En cada ensayo de la prueba, se utilizaron los testigos siguientes: de antígeno, de suero positivo y negativo, de hemolisina, de complemento y de eritrocitos. Se consideró como prueba positiva aquella que no presentaba hemólisis, tomándose el título como la más alta dilución del suero que no presentaba hemólisis. Esta prueba se realizó con todos los sueros frente a antígenos fúngicos estudiados excepto los CPP-D's.

5) Ensayo inmunoenzimático (ELISA).

La prueba de ELISA, se realizó según la técnica indirecta de Voller y cols. (72). Se utilizaron placas de 96 pozos (NUNC) de fondo plano, conteniendo por pozo de 50 a 100 µg de proteína del antígeno (crudo o purificado) por 100 µl de amortiguador de recubrimiento (carbonato-bicarbonato, pH 9.6). Se lavó 3 veces con PBS-Tween. Se agregaron 100 µl de albúmina sérica bovina al 3% y se dejó incubar a temperatura ambiente 1 hora para bloquear

los sitios libres y se volvió a lavar con PBS-Tween. Se aplicó a cada pozo 100 µl de cada dilución del suero problema (1:20 hasta 1:2560) en amortiguador salino de fosfatos-tween, pH 7.4, durante 18 horas a 4°C. Para revelar se utilizó 100 µl del conjugado polivalente anti-gammaglobulinas humanas acoplado a peroxidasa (SIGMA) a una dilución 1:870 en el mismo amortiguador y se incubó 3 horas a temperatura ambiente. Se añadió posteriormente 100 µl de la solución de sustrato orto-fenildiamina (SIGMA) a 40 mg/100 ml de amortiguador (ácido cítrico-fosfato dibásico de sodio, pH 5.0). Se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante aproximadamente 10 minutos. Se detuvo la reacción adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 2.5 M a cada pozo y las placas se leyeron a 492 nm en un lector de microELISA (DINATECH LABORATORIES), expresando el valor de cada suero con base en la dilución más alta que presentó positividad, corrigiendo los valores con la absorbancia no específica de sueros normales.

Esta técnica fue llevada a cabo en los sueros que presentaron reacción positiva en por lo menos 2 de las pruebas humorales descritas anteriormente (RFC, ID, CIE) para comparar la reactividad y sensibilidad de los antígenos crudos con aquellos purificados (CPP-D's). No se realizó en todos los sueros del estudio debido a que el antígeno utilizado en ELISA debe ser ajustado en proteínas (80-100 µg proteína/100 µl en cada pozo) requiriéndose una cantidad considerable para cada prueba, y el rendimiento de los CPP-D's a partir del filtrado del cultivo es muy bajo (aproximadamente del 1%).

RESULTADOS

Las características de la población de los pacientes estudiados se pueden ver en la tabla 1, donde se observa que de los 186 individuos, el 38.7% de la población fueron del sexo femenino y el 61.3% del masculino; la mayoría de los pacientes (54.9%) contaban entre 31 y 60 años de edad. Al 59.5% se les diagnosticó tuberculosis pulmonar (TBP), al 2.7% histoplasmosis y al 37.8% otras enfermedades respiratorias al ingreso al hospital.

La distribución de la República Mexicana considerando la procedencia de los individuos estudiados se hizo tomando en cuenta la división del país en doce regiones de mayor a menor marginación de la población (42). En la tabla 2 se observa que la mayoría de los individuos provenían del Distrito Federal (28.8% con respecto al lugar de nacimiento y 49.2% con respecto al lugar de residencia) y de la zona centro del país que comprende los estados de México y Morelos (16.6% con respecto al lugar de nacimiento y 26.4% con respecto al de residencia). Por otro lado, ningún enfermo procedió de las zonas sureste y pacífico norte.

El resultado de las pruebas de IDR en el total de la población estudiada se puede contemplar en la tabla 3. Los 6 casos de histoplasmosis comprobada, dieron reacción positiva con histoplasmina. El mayor porcentaje de positividad de pruebas cutáneas (IDR) se encontró al utilizar el antígeno candidina

(29%).

Los datos de la distribución de la respuesta a la IDR de acuerdo a la procedencia de los individuos estudiados se observa en la tabla 4. El mayor número de reactores cutáneos positivos a los antígenos fúngicos probados provinieron del D.F. (región XII), seguidos de los estados de México y Morelos (región VIII), de la región IV (centro occidente) y de la II (centro este). En la tabla 4 además se pudo observar la reactividad de la IDR discriminando cada antígeno. Así la histoplasmina dió en la región XII (D.F.), una positividad de 3.2% (tanto en el lugar de nacimiento como el de residencia), el 2.1% de las IDR's positivas a la coccidioidina corresponden a la región XII (D.F.) y el 1.07% a la región VIII (centro); el 3.2% de las IDR's positivas a la paracoccidioidina correspondió a la zona XII (D.F.) y el 1.6% a la región I (pacífico sur), habiendo aumentado la positividad a este antígeno en la región VIII (Centro) (de 0 a 0.5%) del lugar de residencia con respecto al de nacimiento. La esporotricina presentó el mismo porcentaje (0.5%) en la región VII (pacífico centro), VIII (centro) y XII (D.F.) con respecto al lugar de residencia. La mayor reactividad a la candidina se presentó en la zona XII (D.F.) con los datos de 9.1% y 12.9% para el lugar de nacimiento y residencia respectivamente; ningún paciente presentó IDR positiva a la blastomicina. Los pacientes provenientes de la región IX (occidente) no presentaron positividad a los antígenos fúngicos.

La tabla 5 muestra la ocupación de los reactores positivos a

la IDR con los antígenos estudiados, donde se puede observar una amplia variabilidad que va desde estudiantes hasta campesinos. Sin embargo, en ciertos casos se puede contemplar una relación entre la respuesta a la IDR y la actividad ocupacional en ciertos pacientes, como puede notarse en dos pacientes de IDR positivos a la paracoccidioidina (MMS y ROA) cuya ocupación fueron de tractorista y campesino, así como otro paciente con IDR positiva a la coccidioidina (HSG) que se refiere como campesino y un paciente con IDR positiva a la esporotricina (TVS) cuya ocupación era recolectar caña de azúcar.

Con relación a la edad de los pacientes, se encontró que la mayoría de los casos positivos a las pruebas intradérmicas realizadas, correspondieron a los individuos que contaban entre 31 y 55 años de edad, para cada antígeno ensayado y los menores porcentajes correspondieron a los límites inferiores y superiores de edad (tabla 6).

En la tabla 7 se puede observar el resultado de los sueros procesados con las pruebas de ID, CIE y de RFC usando los diferentes antígenos estudiados. Los resultados muestran que la mayor reactividad la presentó la candidina, seguido de la histoplasmina. Se observaron resultados negativos en la prueba de CIE con los antígenos coccidioidina, paracoccidioidina y esporotricina y en RFC con coccidioidina.

Considerando la alta reactividad de algunos pacientes al antígeno de candidina como lo indica la tabla 7 (7.5% en ID, 9.1%

en CIE y 4.3% en RFC) y teniendo en cuenta que el 15.59% de los pacientes estudiados presentaron TBP y diabetes (tabla 8), y además que esta última afección es un factor predisponente en la adquisición de micosis oportunistas, se trató de relacionar la asociación TBP/diabetes con una posible infección por candida a través de la respuesta humoral obtenida a antígenos de este hongo. Se encontró una probable asociación con candidiasis en 7 pacientes de un total de 18 con TBP/diabetes (tabla 8). En estos 7 pacientes se encontraron ya sea IDR positivas a la candidina o bien pruebas serológicas positivas (ID, CIE con bandas de precipitación), además de títulos altos en RFC y ELISA para antígenos de C. albicans sugestivos de candidiasis.

Otra prueba humoral realizada fue ELISA, a pesar de que no es aún muy usual en el serodiagnóstico de las micosis. Sin embargo, por el alto costo de esta metodología, se escogieron para realizarla, solamente los sueros que presentaron al menos, dos pruebas humorales positivas con el antígeno respectivo. La alta sensibilidad de esta técnica se puede observar en la tabla 9 donde se muestra el resultado de los sueros probados con los antígenos fúngicos crudos. Los dos primeros pacientes los cuales fueron clasificados desde el inicio del estudio como histoplasmosos presuntivos (DGC, AGC), presentaron positividad con todos los antígenos, a excepción de la esporotricina. Los cuatro pacientes restantes con histoplasmosis comprobada (GGR, AGR, MGGR Y AMP) presentaron los más altos títulos en ELISA frente al antígeno homólogo histoplasmina. Sin embargo dieron reactividad cruzada

con títulos menores con los antígenos de coccidioidina, paracoccidioidina, candidina y aspergina. El paciente con aspergilosis (AVT) dio un alto título (1:2560) con el antígeno hemológico y cruce a títulos bajos con la paracoccidioidina (1:320), candidina (1:80) y con un antígeno purificado (PP-0-paracocci) (1:40) (resultado no mostrado). El paciente (EEH) exhibió positividad con el antígeno paracoccidioidina e histoplasmina a título de 1:160 y candidina 1:40; además presentó positivas las pruebas de ID y RFC a paracoccidioidina. De cinco pacientes (JLC, RJS, NAR, BRD y AJM) mencionados con anterioridad en la tabla 8 que padecían TRP/diabetes y que podrían presentar una probable candidiasis de acuerdo a sus resultados serológicos en ID, CIE o RFC, se hicieron ELISA solamente con el antígeno candidina dando títulos elevadísimos que varían de 1:320 a 1:2560. Según los datos presentados en la tabla 9, tres pacientes (GAA, JAR y GBS) también presentaron títulos altos a la candidina y estos títulos corroboran los resultados encontrados en las pruebas de IDR, ID, CIE y RFC. Uno de ellos (JAR), a pesar de presentar un título bajo en ELISA (1:40) mostró IDR positiva, título de 1:8 en RFC y una banda en ID.

Para una confirmación más fina de la reactividad de los sueros de los pacientes estudiados, estos fueron procesados en ELISA usando antígenos purificados que podrían desarrollar mayor especificidad en la prueba. Los resultados se pueden observar en la tabla 10. En los primeros seis pacientes con histoplasmosis comprobada se puede observar que los títulos de ELISA con los

antígenos purificados (CPP-D's) de Histoplasma son tan elevados como aquellos obtenidos con el antígeno crudo histoplasmina (1:640 a 1:2560). En estos mismos pacientes se puede observar que el título de ELISA baja notablemente al utilizar los CPP-D's heterólogos CPP-D-cocci y CPP-D-paracocci. Por otro lado, el paciente (EEH) con probable paracoccidioidomicosis, exhibe un aumento en el título al realizar esta prueba con el CPP-D-paracocci (1:640) y el cruce serológico baja significativamente con CPP-D-histo (1:40). En esta misma tabla se notan los bajos títulos encontrados (1:20 a 1:160) con los CPP-D-s heterólogos y una reacción negativa con el antígeno heterólogo CPP-D-cocci.

A pesar que la blastomicina se utilizó en todas las pruebas inmunológicas realizadas, siempre mostró un resultado negativo, comprobando su eficiencia con un suero hiperinmune de conejo anti-B.dermatitidis.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

González Ochoa (19) y Carrada (6) realizaron una encuesta epidemiológica en hospitales para tuberculosos, en la búsqueda de histoplasmosis. Becerril y cols. (4), encontraron asociaciones micóticas en una población de pacientes con enfermedades respiratorias. En el presente estudio se investigaron 186 pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), ya que en él se encuentran hospitalizados pacientes con diversas nosologías pulmonares, de las cuales, un alto porcentaje tiene un diagnóstico dudoso lo que sugiere enfermedades de tipo micótico. De la población estudiada el 37.3% presentó una baciloscopia negativa para TBP.

El mayor porcentaje de pacientes estudiados corresponde al D.F. (49.2% con respecto al lugar de residencia), y es precisamente en esta zona donde se encuentra la mayor positividad en IDR a los diferentes antígenos fúngicos utilizados (tabla 4). Esto puede deberse al flujo poblacional que existe entre la provincia y la capital, fenómeno ampliamente conocido.

Al ubicar la procedencia de los pacientes según las regiones de la República Mexicana, se observó que la positividad a la coccidioidina en IDR (3.2%) no coincidió con la zona endémica de coccidioidomicosis que corresponde a la región norte del país; el porcentaje de casos positivos puede explicarse de dos maneras,

una, que el paciente en algún momento estuvo en la región endémica habiéndose sensibilizado (los datos obtenidos de los expedientes no son claros sobre los años de vida en el lugar de nacimiento y en el lugar de residencia), o bien, la respuesta detectada puede deberse al cruce de otros antígenos como la paracoccidioidina e histoplasmina. Los porcentajes de positividad a la IDR con la paracoccidioidina coincide en algunos casos con la zona endémica de paracoccidioidomicosis del país, que se encuentra principalmente en la región de la huasteca y en algunas zonas tropicales. La histoplasmosis se ha encontrado en todos los estados de la República Mexicana, con excepción de Tlaxcala (71), sin embargo, el hábitat de su agente etiológico H. capsulatum, está restringido a suelos asociados con guano de murciélago y excretas de aves, en cuevas o minas abandonadas, lo que explicaría el bajo porcentaje de IDR positivas, ya que ésta reacción se presentaría solamente en individuos que de alguna manera estuvieran relacionados con los lugares donde se encuentra el hongo. Todos los pacientes del estudio que presentaron positividad a la IDR, habían estado en una cueva en Guerrero, donde adquirieron la histoplasmosis.

Los resultados negativos obtenidos con el antígeno de B. dermatitidis, son congruentes con la distribución geográfica de la blastomicosis norteamericana presente solamente al norte de México. En el país solo existe un caso informado de esta micosis, probablemente importado de E.U.A. (40)

En humanos, la mayor frecuencia de infecciones fúngicas en

el sexo masculino se ha relacionado con el carácter ocupacional, ya que son los hombres los que están más expuestos al hábitat natural del hongo debido a su actividad laboral (54). Esto puede observarse al analizar la ocupación de algunos pacientes que presentaron una IDR positiva a los antígenos probados, entre los cuales encontramos peones, campesinos, tractoristas, etc. (tabla 5). Cabe hacer notar que uno de los pacientes que presentó una IDR positiva a la esporotricina, tenía como ocupación coleccionar caña de azúcar, lo que corrobora el hábitat de S.schenckii en material vegetal. Esta asociación de S.schenckii está bien ejemplificada con el alto porcentaje de positividad de IDR a la esporotricina que encontrara González Ochoa (17) entre los empaquetadores de cerámica que manejan constantemente la paja.

La prueba de IDR con candidina es ampliamente utilizada entre pacientes internados en hospitales para caracterizar el estado de la respuesta inmune celular del individuo. En la población normal al aplicar la IDR con candidina se obtiene entre un 60 y 80% de positividad (Toriello, datos no publicados). Los resultados de este estudio con pacientes hospitalizados muestran un 29% (tabla 3) lo que sugiere una respuesta inmunológica celular deprimida en ellos. Por otro lado, en el presente estudio se pudo observar una tendencia hacia la negativización de esta prueba en los límites inferiores y superiores de edad. Esto fue más evidente con el antígeno de C.albicans ya que del 29% con IDR positiva, el 26.7% correspondió a los pacientes entre 16 y 70 años de edad, 2.1% a mayores de 70 y 0% a menores de 16 años. Al

Comparar estos resultados con un modelo murino de infección con H. capsulatum, donde Reyes Montes y cols. (52,53) demuestran una menor resistencia a la enfermedad en ratones jóvenes y viejos con relación a los adultos, se podría sugerir que los mecanismos de regulación inmunológica no están expresados a toda su capacidad en los límites de edad.

Debido a la presencia de un componente alérgico en A. fumigatus (13,54), se omitió la utilización de la aspergilina en la prueba de IDR a fin de evitar reacciones adversas en los pacientes.

En los resultados de las pruebas humorales se encontró que la candidina fue el antígeno que presentó la mayor reactividad, tanto en ID, CIE como en RFC. Estos resultados hacen pensar en que la candidiasis, como una micosis oportunista, pudiera estar presente en estos pacientes. Al investigar si existían padecimientos asociados, se encontró que el 15.59% de la población total presentaba tuberculosis con diabetes. Es un hecho reconocido que la diabetes es un importante factor predisponente en la adquisición de candidiasis (54). Por lo tanto, en la tabla 8 se hizo una relación de los pacientes que presentaron TBP asociada con diabetes junto con los resultados de las pruebas inmunes a C. albicans. Se encontró serológicamente una asociación micótica de candidiasis en 7 pacientes (24%) de los 29 (15.59%) que mostraron una TBP con diabetes tomando como sugestivo una RFC con títulos superiores a 1:8, siempre y cuando también presenta-

ra el paciente precipitinas específicas. Este resultado coincide con el trabajo de Becerril y cols. (4) donde también observaron un 25% de asociación micótica de candidiasis en pacientes con TBP y diabetes. Estos hechos traducen la importancia de realizar estudios serológicos con antígenos de Candida en los pacientes con las características antes mencionadas.

Después de la mayor reactividad humoral de la candidina, siguió la de la aspergilina. Entre estos pacientes se encontró un caso de aspergilosis comprobada por cultivo que dió todas las pruebas positivas. Sin embargo, el porcentaje restante que también presentó reacciones positivas, probablemente pueda ser debido a reacciones cruzadas con los otros hongos estudiados. En estudios posteriores (46) se ha visto que el antígeno adecuado para el diagnóstico serológico de la aspergilosis sería el antígeno citoplásmico ya que éste no presenta reacciones cruzadas con otros hongos y si demuestra una buena reactividad inmune, mientras que el antígeno metabólico, utilizado en este estudio, mostró cruce inmune.

Entre los pacientes que presentaron pruebas humorales positivas a la paracoccidioidina se encontró uno (EEH) que probablemente padecía la enfermedad, ya que no solo presentó bandas en ID y un título de 1:64 en RFC sino que al realizar también la prueba de ELISA con el antígeno homólogo purificado, dió alto título (1:640) que contrasta con el bajo título (1:40) presentado con el antígeno heterólogo CPP-D-histo. Estos resultados muestran la

gran utilidad de los CPP-D's en pruebas sensibles de diagnóstico como ELISA, en comparación con los productos crudos. El cruce inmune de los CPP-D's es considerablemente menor. Los resultados de las pruebas humorales con el antígeno de C. immitis no mostraron ninguna asociación micótica pero si la reactividad cruzada que es ya conocida con H. capsulatum, B. dermatitidis y P. brasiliensis (5,10,26,49,60).

Es interesante hacer notar que dos de los pacientes (DGC y AGC) con histoplasmosis comprobada, presentaron al mismo tiempo, dermatofitosis en los pies, ides (manifestaciones alérgicas) en las manos y diabetes. El resultado de las pruebas serológicas demostró una alta reactividad cruzada entre el suero de estos pacientes y todos los antígenos (con excepción de la blastomicina) en una o más de las 5 pruebas inmunológicas realizadas.

Después de haber desarrollado las pruebas de ID, CIE y RFC se observó el comportamiento de los antígenos crudos y de los purificados obtenidos de H. capsulatum, P. brasiliensis y C. immitis en una prueba humoral de mayor sensibilidad como es la ELISA. Debido al alto costo de esta prueba solamente se escogieron aquellos sueros que presentaron al menos 2 pruebas positivas entre la ID, CIE y RFC con los antígenos respectivos, además de aquellos pacientes con micosis comprobada. Los antígenos purificados (CPP-D's) han sido demostrados útiles en diferentes pruebas serológicas (59,60,62) y estos resultados demuestran otra vez, su eficacia en ELISA ya que el cruce inmune disminuye considerablemente al utilizarlos como antígenos heterólogos. La tabla 9

muestra los resultados de ELISA con los antígenos crudos de H.capsulatum, C.immitis, P.brasiliensis, así como aquellos obtenidos de A.fumigatus, C.albicans y S.schenckii. Se puede observar el cruce existente entre los antígenos de micosis profundas y aquellos de A.fumigatus y C.albicans. Sin embargo cabe mencionar otra vez que el cruce inmune con A.fumigatus probablemente pueda ser eliminado al utilizar el antígeno somático del mismo hongo (46). Con respecto a la candidiasis aquí resalta la utilidad del antígeno somático para detectar asociaciones micóticas. Estos pacientes con títulos altos de ELISA corresponden a los mismos de la tabla 8 con una probable candidiasis según criterios serológicos (63). Es interesante que tres pacientes (NAR, JAR y GVS), sin la característica de presentar TBP/diabetes, también podrían ser serológicamente presuntivos de candidiasis, ya que presentaron algunas de las diferentes pruebas serológicas positivas (ID, CIE y RFC) además de ELISA (tabla 9). Con respecto al antígeno de S.schenckii se puede observar su especificidad ya que las pruebas de ELISA realizadas siempre dieron negativas con la esporotricina a pesar que los mismos pacientes (DGC, AGC, EEH y AVT) presentaron cruce con algunos de los antígenos de otros hongos. Este antígeno ha sido ampliamente estudiado (1,17,21,28,61) y en su composición química de ramnoasana, presenta un azúcar raro entre los hongos, la ramnosa (65) a lo que diversos autores atribuyen su especificidad.

En trabajos anteriores se ha estudiado la composición química de los CPP-D's de H.capsulatum, C.immitis, P.brasiliensis y

B. dermatitidis (62), así como su reactividad en diferentes pruebas serológicas (51,59,60). Se encontró que están compuestos en su mayoría por carbohidratos, proteínas y trazas de ácidos nucleicos. La fracción de carbohidratos está constituida por manosa, glucosa y bajos porcentajes de galactosa (62) de manera similar en los cuatro hongos. De ahí probablemente el gran cruce inmune que presentan entre ellos. Al tratar de eliminar la fracción antigénica de cruce, Jiménez Montiel y cols. (29) ensayaron tratamientos con α y β -galactosidasa, en los antígenos crudos y CPP-D's de los cuatro hongos, mostrando que la unidad de cruce importante no es debida a residuos no reductores de galactosa y que estos antígenos contienen galactosa unida por enlaces β . En un estudio previo por Taylor y Bojalil (59) ya se había mostrado la presencia de estos enlaces β en el CPP-D-histo al tratarlo con α y β glucosidasa demostrando la presencia de β -glucanas en este antígeno. Estos CPP-D's exhiben una mayor utilidad que los antígenos crudos, sobretudo en pruebas sensibles como ELISA, valorado y demostrado en el presente trabajo y en el trabajo de Becerril y cols. (4), ya que se pudo observar un menor grado de cruce inmune al utilizarlos en la prueba de ELISA.

De manera general, en este estudio se demostró la utilidad de los antígenos obtenidos de diversos hongos en las diferentes pruebas inmunológicas realizadas para el diagnóstico y pronóstico de las micosis. Debido a los resultados mostrando asociaciones micóticas en pacientes con otras enfermedades, se recomienda la utilización de los antígenos de micosis oportunistas en aquellos

pacientes que exhiban factores predisponentes hacia ellas como sería la presencia de diabetes. Se sugiere además, la utilización de los antígenos purificados CPP-D's de *H. capsulatum*, *C. immitis* y *P. brasiliensis* para las pruebas serológicas sensibles de diagnóstico como lo sería ELISA por exhibir un menor grado de cruce inmune.

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. Características de la población estudiada.
- TABLA 2. Datos de procedencia de los individuos estudiados.
- TABLA 3. Respuesta a la intradermorreacción.
- TABLA 4. Distribución de la respuesta de IDR a antígenos fúngicos en la República Mexicana.
- TABLA 5. Relación entre la respuesta de IDR y la ocupación en la población estudiada.
- TABLA 6. Frecuencia de la respuesta a la IDR con antígenos fúngicos en diferentes grupos etarios de pacientes.
- TABLA 7. Respuesta de los 186 pacientes estudiados en pruebas humorales utilizando antígenos fúngicos.
- TABLA 8. Relación entre pacientes con tuberculosis/diabetes y positividad a pruebas inmunológicas a candidina.
- TABLA 9. Prueba de ELISA realizada en muestras séricas de pacientes con antígenos crudos.
- TABLA 10. Comparación de la actividad de antígenos crudos y purificados (CPP-D) en ELISA.

TABLA I

CARACTERISTICAS DE LA POBLACION ESTUDIADA
(106 PACIENTES)

DATOS GENERALES		FRECUENCIA (X)
SEXO	FEMENINO	38,7
	MASCULINO	61,3
EDAD	11-30 AÑOS	22,6
	31-60 AÑOS	54,9
	61-90 AÑOS	22,5
DIAGNOSTICO PRESUNTIVO*	TUBERCULOSIS PULMONAR	59,5
	HISTOPLASMOSIS	2,7
	OTRAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS	37,8
BACILOSCOPIA	POSITIVA	49,7
	NEGATIVA	37,3
	NO REALIZADA	13,0

*Diagnóstico presuntivo al ingreso en el INER.

TABLA 2

DATOS DE PROCEDENCIA DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS

	REGIONES	% L.Nac.	% L.Res.		REGIONES	% L.Nac.	% L.Res.
I	PACIFICO SUR Chiapas Guerrero Oaxaca	13.6	9.2	VII	PACIFICO CENTRO Durango Nayarit Sinaloa	2.7	2.7
II	CENTRO ESTE Hidalgo Puebla Tlaxcala	13.6	4.3	VIII	CENTRO México Morelos	16.8	26.4
III	CENTRO NORTE San Luis Potosí Zacatecas	3.3	2.2	IX	OCCIDENTE Aguascalientes Colima Jalisco	0.5	0
IV	CENTRO OCCIDENTE Guanajuato Michoacán Querétaro	13.1	4.3	X	NORTE Coahuila Chihuahua Nuevo León Tamaulipas	2.2	0.6
V	SURESTE Campeche Quintana Roo Yucatán	0	0	XI	PACIFICO NORTE Baja California B.C.S. Sonora	0	0
VI	GOLFO CENTRO Tabasco Veracruz	4.9	1.1	XII	FISIOTE FEIEPAL Ciudad de México	29.8	49.2

* La regionalización de la República Mexicana se realizó de acuerdo a la sugerida por el programa IMSS-COPLAMAR (42).

TABLA 3

RESPUESTA A LA INTRADERMOREACCION

ANTIGENO	CASOS POSITIVOS	PORCIENTO
HISTOPLASMINA	6*	3.2
COCCIDIODINA	6	3.2
PARACOCCIDIODINA	12	6.5
CANDIDINA	54	29.0
ESPOROTRICINA	3	1.6

Se consideró como población total los 186 pacientes estudiados.

* Casos comprobados de histoplasmosis.

TABLA 4

DISTRIBUCION DE LA RESPUESTA DE IIR A ANTIGENOS FUNGICOS EN LA REPUBLICA MEXICANA

REGION	ANTIGENO	% L. Nac.	% L. Res.	REGION	ANTIGENO	% L. Nac.	% L. Res.
I	Histoplasma	0	0	VII	Histoplasma	0	0
	Coccidioidina	0	0		Coccidioidina	0	0
	Paracoccidioidina	1.6	1.6		Paracoccidioidina	0	0
	Candidina	1.07	1.07		Candidina	0.5	0.5
	Esporotricina	0	0		Esporotricina	0.5	0.5
II	Histoplasma	0	0	VIII	Histoplasma	0	0
	Coccidioidina	0	0		Coccidioidina	1.07	1.07
	Paracoccidioidina	1.07	0		Paracoccidioidina	0	0.5
	Candidina	4.8	2.1		Candidina	6.4	10.2
	Esporotricina	0	0		Esporotricina	0	0.5
III	Histoplasma	0	0	IX	Histoplasma	0	0
	Coccidioidina	0	0		Coccidioidina	0	0
	Paracoccidioidina	0	0		Paracoccidioidina	0	0
	Candidina	0.5	0.5		Candidina	0	0
	Esporotricina	0	0		Esporotricina	0	0
IV	Histoplasma	0	0	X	Histoplasma	0	0
	Coccidioidina	0	0		Coccidioidina	0	0
	Paracoccidioidina	0.5	0.5		Paracoccidioidina	0	0.5
	Candidina	4.8	0.5		Candidina	0.5	0.5
	Esporotricina	0.5	0		Esporotricina	0	0
VI	Histoplasma	0	0	XII	Histoplasma	3.2	3.2
	Coccidioidina	0	0		Coccidioidina	2.1	2.1
	Paracoccidioidina	0	0		Paracoccidioidina	3.2	3.2
	Candidina	1.07	0.5		Candidina	9.1	12.9
	Esporotricina	0	0		Esporotricina	0.5	0.5

* Los estados que comprenden cada región son los mismos que en la tabla 2. Las regiones V y XI no se incluyen por ausencia de pacientes de estas zonas.

TABLA 5
 RELACION ENTRE LA RESPUESTA DE IIR Y LA
 OCUPACION EN LA POBLACION ESTUDIADA*

PACIENTE**	IDR positiva at	OCUPACION
DGC***	Histoplasmina Paracoccidioidina	Chofer
IAGC***	Histoplasmina Coccidioidina	Empleado federal
ITVS	Esporotricina	recolector de caña de azúcar
IGR***	Histoplasmina Coccidioidina	estudiante
IAGR***	Histoplasmina Paracoccidioidina	estudiante
INGR***	Histoplasmina Coccidioidina	estudiante
IJFO	Coccidioidina	peón
IBPO	Coccidioidina Paracoccidioidina	hogar
IEBD	Paracoccidioidina	hogar
INMS	Paracoccidioidina	tractorista
IACM	Paracoccidioidina	albañil
INGB	Esporotricina	desempleado
IROA	Paracoccidioidina	campesino
IAMP***	Histoplasmina	chofer
INSG	Coccidioidina	campesino
IBCJ	Esporotricina	hogar
IHE	Paracoccidioidina	hogar
IFCR	Paracoccidioidina	chofer
IHP	Paracoccidioidina	chofer
IHEL	Paracoccidioidina	hogar
ILPM	Paracoccidioidina	hogar

*Se consideraron todos los individuos que dieron positiva la IIR, con excepción de la candidina.

**Iniciales de cada paciente.

***Pacientes con histoplasmosis comprobada.

TABLA 6

FRECUENCIA DE RESPUESTA A LA IDR CON ANTIGENOS FUNGICOS EN DIFERENTES GRUPOS ETARIOS DE PACIENTES

ANTIGENOS	GRUPOS ETARIOS (años)				
	10-15	16-30	31-55	56-70	71-90
Histoplasmina	1.07	1.07	1.07	0	0
Coccidioidina	0.5	0.5	1.6	0.5	0
Paracoccidioidina	0.5	1.6	2.1	1.6	0.5
Candidina	0	6.5	13.4	6.4	2.1
Esporotricina	0	0	0.5	0.5	0.5

TABLA 7

RESPUESTA DE LOS 166 PACIENTES ESTUDIADOS
EN PRUEBAS HUMORALES UTILIZANDO
ANTIGENOS FUNGICOS

ANTIGENOS	FRECUENCIA DE PRUEBAS HUMORALES POSITIVAS (%)		
	ID	CIE	RFC
Histoplasmina	3.2	3.2	6.4
Coccidioidina	1.6	0	0
Paracoccidioidina	2.6	0	3.2
Aspergiline	3	0.5	2.1
Candidina	7.5	9.1	4.3
Esporotricina	1.0	0	1.0

ID=Inmunodifusión

CIE=Contrainmunolectroforesis

RFC=Reacción de fijación de complemento

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

TABLA 3

RELACION ENTRE PACIENTES CON TUBERCULOSIS-DIABETES Y POSITIVIDAD A PRUEBAS INMUNOLOGICAS A CANDIDINA

PACIENTES CON TBP Y DIABETES	POSITIVIDAD A PRUEBAS INMUNES
CRA*	RFC (1:16)
AGA*	IDR, CIE, RFC (1:16), ELISA (1:1280)
SGR	ID
JLC*	CIE, RFC (1:8), ELISA (1:1280)
DPH	IDR
MBE	IDR
RJS*	CIE, RFC (1:8), ELISA (1:2560)
CZB	RFC (1:8)
GVC	CIE
BRD*	CIE, RFC (1:16), ELISA (1:1280)
HHE	IDR
LAG	IDR
DOO	RFC (1:8)
AJM*	IDR, ID, CIE, RFC(1:8), ELISA (1:640)
DHP	CIE
SET	CIE

El 15.59 % de todos los pacientes estudiados presentaron tuberculosis y diabetes.

*pacientes con una probable candidiasis

TAULA 9

PRUEBA DE ELISA REALIZADA EN MUESTRAS SERICAS DE PACIENTES CON ANTIGENOS CRUDOS

PACIENTE	Histoplasmina	Coccidioidina	Paracoccidioidina	Aspergilina	Candidina	Esporotricina
DGC**	1:2560	1:1280	1:1280	1:320	1:2560	negativo
AGC**	>1:2560	1:1280	1:1280	1:160	1:1280	negativo
GBR*	1:2560	1:320	1:640	negativo	1:160	negativo
AGR*	1:1280	1:640	1:1280	negativo	negativo	negativo
WGR*	>1:2560	1:640	negativo	1:40	negativo	negativo
AMP*	1:640	negativo	1:80	negativo	negativo	negativo
EEH	1:160	negativo	1:160	negativo	1:40	negativo
AWT***	negativo	negativo	1:320	1:2560	1:80	negativo
JLC					1:1280	
RJS					1:2560	
ABA					1:1280	
BRD					1:1280	
AJM					1:640	
NAR					1:2560	
JAR					1:40	
GBS					1:320	

Se utilizó la prueba de ELISA con el conjugado peroxidasa antigaglobulina humana. Se leyó a 492 nm. Las lecturas fueron corregidas con los valores promedio de los sueros controles normales.

*Pacientes con histoplasmosis comprobada.

**Pacientes con histoplasmosis comprobada y diabetes.

***Paciente con aspergilosis comprobada.

TABLA 10

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE ANTIGENOS CRUDOS Y PURIFICADOS
(CPP-D) EN ELISA

PACIENTE	HISTOPLASMINA		COCCIDIODINA		PARACOCCIDIODINA	
	crudo	CPP-D	crudo	CPP-D	crudo	CPP-D
DGC*	1:2560	1:2560	1:1280	1:80	1:1280	negativo
ABC*	>1:2560	1:2560	1:1280	1:160	1:1280	1:40
GGR*	1:2560	1:1280	1:320	1:20	1:640	1:160
ARR*	1:1280	1:1280	1:640	1:20	1:1280	1:40
NGRR*	1:2560	1:2560	1:640	1:40	negativo	negativo
AMP*	1:640	1:640	negativo	negativo	1:80	negativo
EEH	1:160	1:40	negativo	NR	1:160	1:640

Se utilizó la prueba de ELISA con el conjugado peroxidasa anti-globulina humana. Se leyó la absorbancia a 492 nm. Las lecturas fueron corregidas con los valores promedio de los sueros controles normales.

*Pacientes con histoplasmosis comprobada.

NR No realizado.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arenas G., Toriello C. Actividad inmunológica de antígenos miceliales y levaduriformes de diferentes fases de crecimiento de *Sporothrix schenckii*. Rev. Mex. Mic. 2:131-144. 1986.
- 2.- Axelsen, N. Quantitative Immunelectrophoretic Methods as Tools of a Polyvalent Approach to Standardisation in the Immunochemistry of *Candida albicans*. Infect. Immun. 7:949-960. 1973.
- 3.- Azuma I., Kanetsuna F., Tanaka Y., Yamamura Y., Carbonell L.M. Chemical and Immunological Properties of Galactomannans Obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. Mycopathol. Mycol. Appl. 54:111-125. 1974.
- 4.- Becerril M., Acosta G., Casasola J., Reborá Gutierrez F., Díaz Gómez M.L., Velasco Castrejón O., Taylor M.L., Toriello C. Investigación de la respuesta inmune a antígenos fungicos en pacientes de un hospital de enfermedades respiratorias. Rev. Mex. Mic. 1:211-226. 1985.
- 5.- Bradley G., Pine L., Reeves M.W., Moss C.W. Purification, Composition and Serological Characterization of Histoplasmin H and M Antigens. Infect. Immun. 9:870-880. 1974.

- 6.- Carrada L.F. Encuesta epidemiológica de micosis en hospitales para tuberculosos. Rev. Med. IMSS. 50:33-38. 1962.
- 7.- Casanova M., Gil M.L., Cardenoso L., Martinez J.P., Santandreu R. Identification of Wall-specific Antigens Synthesized During Germ Tube Formation by Candida albicans. Infect. Immun. 57:262-271. 1989.
- 8.- Connant N.F., Smith D.T. Micología Médica. Editorial Interamericana. 3a.ed. México, D.F. 1981.
- 9.- Cox R.A., Larsh H.W. Isolation of Skin Test-active Preparations from Yeast Phase Cells of Blastomyces dermatitidis. Infect. Immun. 10:42-47. 1974.
- 10.- Cox R.A. Cross Reactivity between Antigens of Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum and Blastomyces dermatitidis in Lymphocyte Transformation Assays. Infect. Immun. 25:932-938. 1979.
- 11.- Denton H.F., Disalvo A.F. Isolation of Blastomyces dermatitidis from Natural Sites in Augusta Georgia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 13:716-722. 1964.
- 12.- Dubois M., Giles K.A., Hamilton J.K., Reber P.A., Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars. Nature. 168:167-173. 1951.
- 13.- Emmons C.W., Chapman H.B., Utz L.P., Twon-Chung Y.J. Medical Mycology. 3a.ed. Lea and Febiger. Philadelphia. 1977.

- 14.- Fellice G., Yu B., Armstrong D. Immunodiffusion and Agglutination Tests for Candida in Patients with Neoplastic Disease: Inconsistent Correlation of Results with Invasive Infections. J. Infect. Dis. 135:349-357. 1977.
- 15.- Gerety R.F., Ferraresi R.W.S. Polysaccharide in Delayed Hypersensitivity I. Pneumococcal Polysaccharide as Inducer and Elicitor of Delayed Reactivity in Guinea Pigs. J. Exp. Med. 131:189-193. 1970.
- 16.- González Mendoza A. Micosis por oportunistas. In: Desarrollo y estado actual de la micología médica en México. Simposio Syntex. Editorial del Inst. Syntex. Mex.D.F. 85-92. 1979.
- 17.- González Ochoa A., Soto Figueroa E. Polisacáridos de Sporotrichum schenckii. Datos inmunológicos. Intradermorreacción en el diagnóstico de la esporotricosis. Rev. Inst. Salubr. Enfer. Trop.Méx. 8:143-153. 1947.
- 18.- González Ochoa A. Las micosis pulmonares en México y Centroamérica. Rev. Inst. Salubr. Enfer. Trop. Méx. 20:129-145. 1960.
- 19.- González Ochoa A., Furcolew M.L. Histoplasmosis in a Mexican Sanatory. Lab. Invest. 2:1134-1139. 1960.
- 20.-González Ochoa A. Epidemiología de la histoplasmosis primaria en México. Rev. Inst. Salubr. Enfer. Trop. Méx. 23:65-80.

1963.

- 21.- González Ochoa A., Ricoy E., Velasco O., Lopez R., Navarrete F. Valoración comparativa de los antígenos polisacárido y celular de *Sporothrix schenckii*. Rev. Inv. Salud Pública, México. 30:303-315. 1970.
- 22.- Green J.H., Harrell W.K., Benson R. Isolation of an Antigen from *Blastomyces dermatitidis* that is Specific for the Diagnosis of Blastomycosis. Current Microbiol. 4:293-296. 1980.
- 23.- Habel K., Salzman N.P. Fundamental Techniques in Virology. Academic Press. New York. 1969.
- 24.- Heiner D.C. Diagnostic of Histoplasmosis Using Precipitin Reactions in Agar Gel. Pediatrics. 22:616-620. 1958.
- 25.- Huppert M., Spratt N.S., Vucovich K.R., Sun S.H., Rice E.H. Antigenic Analysis of Coccidioidin and Spherulin Determined by Two Dimensional Immunoelectrophoresis. Infect. Immun. 20:541-551. 1978.
- 26.- Huppert M., Adler J.P., Rice E.H., Sun S.H. Common Antigens among Systemic Disease Fungi Analysed by Two Dimensional Immunoelectrophoresis. Infect. Immun. 23:479-485. 1979.
- 27.- Huppert M., Sun S.H., Harrison S. Morphogenesis throughout Saprobitic and Parasitic Cycles of *Coccidioides immitis*. Mycopathologia. 78:107-122. 1982.
- 28.- Ishizaki H., Nakamura Y., Wheat R.W. Serological Cross-

- reactivity between Sporothrix schenckii and Various Unrelated Fungi. Mycopathologia. 73:65-68. 1981.
- 29.- Jiménez Montiel J.A., Taylor M.L., Toriello C. Efecto del tratamiento con α y β -galactosidasas en antígenos de hongos productores de micosis profundas. Bioquímica. 1/1:13-18. 1988.
- 30.- Kamel S.M., Wheat L.J., Garten M.L., Bartlett M.S., Tansey M.R., Tewari R.P. Production and Characterization of Murine Monoclonal Antibodies to Histoplasma capsulatum Yeast Cell Antigens. Infect. Immun. 57:896-901. 1989.
- 31.- Kaufman L., Mc Laughlin D.H., Clark M.J., Blumer S. Specific Immunodiffusion Test for Blastomycosis. Appl. Microbiol. 26:244-247. 1973.
- 32.- Kaufman L., Standard P., Padhye A.A. Exoantigen Tests for the Immunoidentification of Fungal Cultures. Mycopathologia. 82:3-12. 1983.
- 33.- Lavalle P. Aspectos clínicos, inmunológicos y epidemiológicos de la esporotricosis. Memorias IV Cong. Méx.Dermatol. Tamps. México. 1978.
- 34.- Lavalle P. Esporotricosis. In: Desarrollo y estado actual de la micología médica en México. Simposio Syntex. Editorial del Inst. Syntex. Méx. D.F. 115-138. 1979.
- 35.- Longbottom J.L., Pepys J. Pulmonary Aspergillosis: Diagnostic and Immunological Significance of Antigens and C-Substance in Aspergillus fumigatus. J. Clin. Invest. 68:141-151.

1964.

- 36.- Lowry O.H., Rosebrough N.Y., Tarr A.L., Randall R.J.
Protein Measurements with the Folin-reagent. J. Biol. Chem.
193:265-275. 1951.
- 37.- Mackenzie D.W.R., Philpot C.M., Proctor A.G.C. Basic
Serodiagnostic Methods for Diseases Caused by Fungi and
Actinomycetes. Public Health. Lab. Ser. 12:31-58. 1980.
- 38.- Mackenzie D.W.R. Serodiagnosis. In: Howard D.H. (Ed). Fungi
Pathogenic for Human and Animals. Part B. Pathogenicity and
Detection: II. Marcel Dekker. New York. 1983.
- 39.- Mariat F. Adaptation de Ceratocystis stenoceras (Robak)
C. Moreau a la vie parasitaire chez l'animal. Etude de la souche
sauvage et des mutants pathogènes. Comparaison avec Sporothrix
schenckii Hektoen et Perkins. Rev. Mycol. 36:3-24. 1971.
- 40.- Martínez Baez M.A., Reyes M.A., González Ochoa A. Blastomi-
cosis norteamericana en México. Rev. Inst. Salubr. Enfer. Trop.
Méx. 14:225-230. 1954.
- 41.- Mohr J.A., Griffith W., Long H. Pulmonary Sporotrichosis in
Oklahoma and Susceptibilities in vitro. Am. Rev. Resp. Dis.
119:961-964. 1979.
- 42.- Necesidades esenciales en México. Salud. Coplamar. Siglo
XXI. México D.F. 1983.
- 43.- Duchterlony O. Diffusion in Gel Methods for Immunological

Analysis. Prog. Allergy. 6:30-36. 1962.

- 44.- Palmer D.F., Kaufman L., Kaplan W., Cavallaro J.J.
Serodiagnosis of Mycotic Diseases. Charles C. Thomas Publisher,
Springfield. 1977.
- 45.- Penn R.L., Lambert R.S., George R.B. Invasive Fungal
Infections. The Use of Serologic Tests in Diagnosis and
Management. Arch. Intern. Med. 143:1215-1220. 1983.
- 46.- Pérez Mejía A., Toriello C. Condiciones óptimas para la
producción de antígenos de Aspergillus fumigatus, A.niger y
A.flavus para el diagnóstico serológico de la aspergilosis.
Rev. Mex. Mic. 5: 261-271. 1989.
- 47.- Puccia R., Schenkman S., Gorin P.A.J., Travassos L.R.
Exocellular Components of a Specific Antigen. Infect. Immun.
53:199-206. 1986.
- 48.- Repentigny de L., Reiss E. Current Trends in
Immunodiagnosis of Candidiasis and Aspergillosis. Rev. Infect.
Dis. 6:301-312. 1984.
- 49.- Restrepo A.M., Moncada L.H. Characterization of the
Precipitin Bands Detected in the Immunodiffusion Test for
Paracoccidioidomycosis. Appl. Microbiol. 28:139-144. 1974.
- 50.- Restrepo A.M. The Ecology of Paracoccidioides brasiliensis:
a Puzzle Still Unsolved. J. Med. Vet. Mycol. 23:323-334. 1985.
- 51.- Reyes Montes M.R., Martínez A., Toriello C., Taylor M.L.

- Antigens from Histoplasma capsulatum and Blastomyces dermatitidis. I. Immunological Comparative Studies from Polysaccharide-Protein Complexes of Both Fungi. *Mycopathologia*. 78:17-23. 1982.
- 52.- Reyes Montes M.R., Casasola J., Elizondo N.E., Taylor M.L. Relationship Between Age and Cellular Suppressive Activity in Resistance to Histoplasma capsulatum Infection. *J. Med. Vet. Mycol.* 23:351-360. 1985.
- 53.- Reyes Montes M.R., García C.M.P., Casasola J., Taylor M.L. Immunosuppression Transfer by Spleen Cells from Young to Adult Mice Previous to Histoplasma capsulatum Infection. *Mycopathologia*. 101:69-75. 1988.
- 54.- Rippon J.W. *Medical Mycology*. 2nd. ed. W.B. Saunders. Philadelphia. 1982.
- 55.- Smith C.E., Saito M.T., Beard R.R., Mc Fadden R.K., Wheat L.C.R., Eddie B.V. Serological Test in the Diagnosis of Cocci-diodomycosis. *Amer. J. Hyg.* 62:1-21. 1950.
- 56.- Sevag M.G. Eine neue Physikalische Enteiweissungsmethode zur Darstellung biologisch wirksamer Substanzen. Isolierung von Kohlenhydraten aus Hühnerweiß und Pneumococcen. *Biochem. A.* 273:419-429. 1934.
- 57.- Soll D.R. Candida albicans. In: Szanislo P.J. (ed). *Fungal Dimorphism*. Plenum Press. New York. 1985.

- 58.- Stambuk B.U., Puccia R., De Almeida M.L.C., Travassos L.R., Schenkman S. Secretion of the 43 kDa Glycoprotein Antigen by Paracoccidioides brasiliensis. J. Med. Vet. Mycol. 26:367-373. 1988.
- 59.- Taylor M.L., Bojalil L.F. Inmunología de la histoplasmosis: aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmunoespecífica a partir de Histoplasma capsulatum. Arch. Invest. Med. (Méx.) 8:91-102. 1977.
- 60.- Taylor M.L., Reyes Montes M.R., Lachica A., Eslava Campos C., Olvera J., Maxwell R. Immunology of Histoplasmosis: Humoral and Cellular Activity from a Polysaccharide Protein Complex and its Deproteinized Fraction in Experimentally Immunized Mice. Mycopathologia. 71:159-166. 1980.
- 61.- Toriello C., Mariat F. Etude comparée des polyosides des champignons Ceratocystis stenoceras et Sporothrix schenckii. Composition chimique et analyse immunologique. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 125A:287-307. 1974.
- 62.- Toriello C., Rosas J.L., Reyes Montes M.R., Taylor M.L. Biochemical Studies of Polysaccharide Protein Antigens from Fungi Causing Systemic Mycoses. In: Baxter, M. (ed). Proc. VIII Congress Int. Soc. Hum. Anim. Mycol. Massey University. New Zealand. 220-224. 1982.
- 63.- Toriello C., Rébora F., Díaz Gómez M.L., Taylor M.L. Criterios para el diagnóstico de aspergilosis y candidosis sistémica. Rev. Mex. Mic. 2:217-229. 1976.

- 64.- Tran Van Ky., Uriel P.J., Rose F. Characterization de types d'activités enzymatiques dans des extraits antigeniques d'Aspergillus fumigatus apres électrophorese et immunoelectrophorese. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 111:161-170. 1966.
- 65.- Travassos L.R., Mendoca-Previato O. Synthesis of Monorhamnosyl L-rhamno-D-mannans by Conidia of Sporothrix schenckii. Infect. Immun. 19:1-4. 1978.
- 66.- Velasco Castrejón O., González Ochoa A. Primary Pulmonar Epidemic Histoplasmosis in an Abandoned Mine. Mykosen. 20:393-399. 1977.
- 67.- Velasco Castrejón O. Paracoccidioidomycosis. Informe Técnico No. 5. Dirección Gral. de Epidemiología, México, D.F. 1981.
- 68.- Velasco Castrejón O. Quelques aspects de l'histoplasmosis en République Mexicaine. Med. Tropicale. 41:681-683. 1981.
- 69.- Velasco Castrejón O. Las micosis en la Salud Pública de México. Bol. Escuela de Medicina. U.A. de Querétaro. II.4:4-6. 1983.
- 70.- Velasco Castrejón O., Fujigaki L.A. Importancia de la histoplasmosis pulmonar primaria en trabajadores de minas. Neumol. Cir. Torax. 44:7-9. 1984.
- 71.- Velasco Castrejón O. Aspectos epidemiológicos de la histoplasmosis en México. Rev. Inv. Salud Pub. 95-97. 1985.

- 72.- Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A Guide with Abstracts of Microplate Applications. Dynatech Europe Laboratories Inc. 37-40. London. 1979.
- 73.- Ward E.R., Cox R.A., Schmith J.A., Huppert M., Sun S.H. Delayed-type Hipersensitivity Responses to a Cell Wall Fraction of the Mycelial Phase of Coccidioides immitis. Infect. Immun. 12:1093-1097. 1975.
- 74.- Yarzabal L.A., Bout D., Andrieu S. Isolation of a Specific Antigen with Alkaline Phosphatase Activity from a Soluble Extract of Paracoccidioides brasiliensis. Sabouraudia. 14:275-280. 1976.
- 75.- Yarzabal L.A., Bout D., Naquira F., Andrieu S. Identification and Purification of the Specific Antigen of Paracoccidioides brasiliensis Responsible for Immuno-electrophoretic Band E. Sabouraudia. 15:79-85. 1977.
- 76.- Yarzabal L.A., Campo-Aasen I., De Cabral N.A. Sub-cellular Localization of Antigen E-2 of Paracoccidioides brasiliensis: an Immunoenzymatic Electron Microscopy Study. Sabouraudia. 18:167-171. 1980.