

109
zej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"RESPUESTA INMUNE HUMORAL A
ANTIGENOS DE
Sporotrix schenckii"

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

JOSÉ FERNANDO LLEDÍAS MARTÍNEZ.

MAYO 1993

**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

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	14
-CULTIVO DE <i>S. schenckii</i>	14
-TRANSFORMACION A LEVADURA	15
-SUEROS	15
-AGLUTINACION DIRECTA	16
-PREPARACION DE EXOANTIGENOS DE LA LEVADURA DE <i>S. schenckii</i>	17
-DETERMINACION DE PROTEINAS	18
-ELISA	18
-ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS	20
-INMUNOTRANSFERENCIA	21
-OXIDACION DEL EXOANTIGENO DE <i>S. schenckii</i> CON PERYODATO EN INMUNOTRANSFERENCIA	22

RESULTADOS	24
-CULTIVO DE <i>S. schenckii</i>	24
-EXOANTIGENO DE LA LEVADURA DE <i>S. schenckii</i>	25
-DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS ANTI - <i>S. schenckii</i>	26
-INMUNOTRANSFERENCIA	28
DISCUSION	32
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	46

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Zonas de mayor incidencia de la esporotricosis en México.
- Fig. 2** Clasificación de las formas clínicas de la esporotricosis.
- Fig. 3** Tipos clínicos de la esporotricosis cutánea.
- Fig. 4** Morfología de las colonias miceliales de *S. schenckii*.
- Fig. 5** Micelio de *S. schenckii* por microscopía de contraste de fase.
- Fig. 6** Fotomicrografía en contraste de fase de la levadura de *Sporothrix schenckii*.
- Fig. 7** Tinción de Gram de las levaduras de *Sporothrix schenckii*.
- Fig. 8** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS del exoantígeno de la levadura de *Sporothrix schenckii*.
- Fig. 9** Evaluación de las placas de soporte y concentración del exoantígeno de la levadura de *S. schenckii* para el ensayo de ELISA.
- Fig. 10** Evaluación de dos diluciones del conjugado anti-inmunoglobulina humana para el ensayo de ELISA.
- Fig. 11** Inmunotransferencia de distintas cantidades del exoantígeno de la levadura de *Sporothrix schenckii*.

- Fig. 12** Reactividad de los anticuerpos de los pacientes con esporotricosis cutánea con exoantígenos de la levadura de *S. schenckii* por inmunotransferencia
- Fig. 13** Comparación por inmunotransferencia de la especificidad de anticuerpos en sueros de pacientes con esporotricosis antes y durante terapia.
- Fig. 14** Reactividad por inmunotransferencia de sueros de pacientes con histoplasmosis pulmonar.
- Fig. 15** Reactividad por inmunotransferencia de sueros de voluntarios sanos.
- Fig. 16** Efecto de la oxidación de carbohidratos por peryodato de sodio en el reconocimiento de exoantígenos de la levadura de *S. schenckii* por sueros de pacientes con esporotricosis.
- Fig. 17** Efecto de la oxidación de carbohidratos por peryodato de sodio en el reconocimiento de exoantígenos de la levadura de *S. schenckii* por sueros de pacientes con histoplasmosis pulmonar.
- Fig. 18** Efecto de la oxidación de carbohidratos por peryodato de sodio en el reconocimiento de exoantígenos de la levadura de *S. schenckii* por sueros de voluntarios sanos.

LISTA DE TABLAS

TABLA I	CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES CON ESPOROTRICOSIS CUTANEA.
TABLA II	TITULOS DE AGLUTINACION DE LEVADURAS DE PACIENTES CON ESPOROTRICOSIS CUTANEA.
TABLA III	TITULOS DE AGLUTINACION DE LEVADURAS DE PACIENTES CON HISTOPLASMOSIS PULMONAR
TABLA IV	TITULOS DE AGLUTINACION DE LEVADURAS DE INDIVIDUOS SANOS.
TABLA V	TITULOS DE ANTICUERPOS ANTI- <i>Sporothrix schenckii</i> EN PACIENTES CON ESPOROTRICOSIS CUTANEA POR ELISA.
TABLA VI	TITULOS DE ANTICUERPOS ANTI- <i>Sporothrix schenckii</i> EN PACIENTES CON HISTOPLASMOSIS PULMONAR POR ELISA.
TABLA VII	TITULOS DE ANTICUERPOS POR AGLUTINACION Y ELISA EN PACIENTES CON ESPOROTRICOSIS BAJO TRATAMIENTO.
TABLA VIII	PORCENTAJES DE REACCION CON LAS BANDAS DEL EXOANTIGENO DE LA LEVADURA DE <i>Sporothrix schenckii</i> POR INMUNOTRANSFERENCIA.

RESUMEN

La esporotricosis es una infección de curso subagudo o crónico causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii* que se presenta en formas cutáneas o extracutáneas. Las más comunes son las formas cutáneas que afectan piel, tejido subcutáneo y sistema linfático. Las formas extracutáneas incluyen a la esporotricosis diseminada sistémica, la cual se observa en pacientes con defectos en la respuesta inmune mediada por células. Pueden distinguirse tres formas de la esporotricosis cutánea: linfocutánea, cutánea fija y cutánea diseminada. Los factores que determinan el tipo y severidad de la esporotricosis cutánea no han sido definidos. La variabilidad en la virulencia de distintos aislados de *S. schenckii* ha sido considerada. También se ha sugerido que la exposición al hongo puede inducir inmunidad, y que en áreas de alta endemicidad, los individuos que muestran hipersensibilidad al hongo no son infectados o el curso de la enfermedad puede ser modificado.

En un esfuerzo para tener un mejor entendimiento de los factores que determinan el desarrollo de las distintas formas de la esporotricosis cutánea se investigó la respuesta inmune humoral a exoantígenos de la levadura de *Sporothrix schenckii* por las técnicas de ELISA e inmunotransferencia empleando sueros provenientes de casos de esporotricosis linfocutánea, fija y cutánea diseminada. Las muestras de estos pacientes mostraron altos títulos de anticuerpos por ELISA. La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la preparación de exoantígenos reveló 9 bandas en un intervalo de 16 a 67 kDa. De forma colectiva 7 de estas bandas mostraron reactividad con anticuerpos en el suero de los pacientes con

esporotricosis por inmunotransferencia. No se observó ninguna diferencia significativa en el perfil de reactividad entre los tres grupos de pacientes. La oxidación del antígeno con peryodato de sodio en el mismo ensayo, redujo de manera importante la actividad serológica de estos sueros lo que sugiere fuertemente que la especificidad de sus anticuerpos esta dirigida a epítopes carbohidratos. Se incluyeron en este análisis, muestras de individuos sanos así como de pacientes con histoplasmosis pulmonar. Aunque en ninguno de estos sueros se encontraron anticuerpos reactivos con la preparación de exoantígenos de la levadura por ELISA, el ensayo de inmunotransferencia mostró reactividad con la banda de 30 kDa con intensidades similares a las observadas para los pacientes con esporotricosis.

INTRODUCCION

La esporotricosis es una micosis subcutánea o profunda de curso subagudo o crónico producida por el hongo dimórfico denominado *Sporothrix schenckii*. Primordialmente afecta a la piel y al sistema linfático en forma de lesiones gomosas¹ y en ocasiones puede presentarse en huesos, articulaciones, meninges u otros órganos como vísceras o pulmones (Rippon, 1982).

El primer caso clínico de esporotricosis fue descrito por Schenck en 1898. Este reporte, describió al hongo aislado de la lesión de un paciente en el Hospital Johns Hopkins de Baltimore como una "sporotrichia", un nombre dado por el micólogo E. F. Smith, quien posteriormente lo clasificó como un hongo del género *Sporotrichium*. El segundo caso fue observado por Hektoen y Perkins, también en los Estados Unidos, quienes clasificaron el hongo en el género *Sporothrix* y crearon la especie *schenckii* (Rippon, 1982). En México, Aguirre Pequeño y Gayón son considerados los primeros en describir casos de esporotricosis, alrededor de 1913 (Bonifaz, 1990).

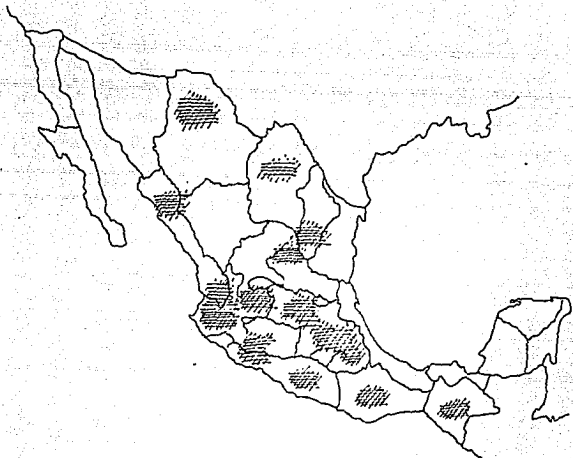
¹ Masa de tejido normal provocada por la proliferación granulomatosa del tejido conectivo normal. Estas masas sufren fenómenos degenerativos o necróticos por ausencia o escasez extrema de vasos sanguíneos nutricios (Ruiz y col., 1984).

La esporotricosis es sin duda la micosis profunda más ampliamente distribuida en el mundo; se ha observado en todos los continentes, pero quizá el mayor número de casos se presenta en América intertropical en donde sobresalen México, Uruguay y Guatemala.

En México se le considera como la segunda en frecuencia dentro de las micosis profundas y de acuerdo con Barba-Rubio del Instituto Dermatológico de Guadalajara, esta micosis es la más importante en el occidente del país (Bonifaz, 1990).

Aunque se han registrado casos en todo el territorio nacional, se observan dos zonas de mayor incidencia: el occidente (Jalisco y Nayarit), y la zona centro, que incluye Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y el Distrito Federal (Figura 1). Esta última entidad alcanza el porcentaje de casos más alto de la zona central lo cual posiblemente se debe a que a esta área ingresan gran cantidad de productos como madera, flores, frutas y verduras, a los cuales el hongo se encuentra asociado, provenientes de estados vecinos donde el hongo ha sido aislado de la tierra, vegetación e incluso habitaciones (Bonifaz, 1990) (Figura 1).

Sporothrix schenckii, pertenece a la Clase-Forma Deuteromycetes, "Fungi Imperfecti" (Alexopoulos, 1962), dado que aparentemente carece de una fase sexual o estado perfecto. Aunque la forma perfecta de *Sporothrix schenckii* no ha sido establecida, varios autores señalan al género *Ceratocystis* un Ascomycete, como posible estado sexual de *S. schenckii*. Esta hipótesis se basa en similitudes morfológicas y en propiedades ecológicas, fisiológicas, inmunológicas y bioquímicas entre ambos hongos (Travassos y col., 1973; Harada y col., 1976; Polonelli y Morace, 1982). Quentin y Weiser (1988) reportan incluso un caso raro, con el cuadro clínico de esporotricosis pero causado por *Ceratocystis stenoceras*. Por



TONADO DE DONIFAZ, A. 1990. MICROLOGÍA MÉDICA BÁSICA
ED. MENDEZ CERVANTES
MÉXICO.

**Fig. 1. Zonas de mayor incidencia de
la esporotricosis en México**

otra parte, la comparación del contenido de guanina y citosina del DNA de varias especies del género *Ceratocystis* mostró que *C. minor* es la más parecida a *S. schenckii* (Mendoca-Hagler y col., 1974). Mariat (1963) ha revisado los problemas taxonómicos concernientes al complejo *Sporothrix-Ceratocystis* y ha señalado una posible relación filogenética entre *S. schenckii*, *C. stenoceras* y otras especies de *Ceratocystis* (Lavalle y Mariat, 1983).

La forma micelial de *Sporothrix schenckii* se ha aislado en múltiples ocasiones del suelo y materiales vegetales como corteza, espinas, hojas, paja, etc., lo cual señala claramente la relación saprofitica del hongo con las plantas (McKinnon y col., 1969), y es precisamente a través de traumatismos o escoriaciones con estos materiales, que el hongo penetra al cuerpo humano. Algunas historias de esporotricosis marcan su inicio con mordeduras de perros, iguanas o armadillos, piquetes de insectos, manejo de pescado, etc., en cuyos casos, la infección es causada posiblemente por la contaminación de la herida con el suelo o con cualquier otro material con el hongo asociado. *S. schenckii* se ha aislado también de pulgas, hormigas; de pezuñas y pelo de animales domésticos e incluso del agua y aire los cuales representan probables vectores para las esporas. Han sido reportadas otras formas de transmisión por el contacto con personas infectadas y el desarrollo de la enfermedad primariamente pulmonar a causa de la inhalación de los conidios en zonas altamente endémicas (Rippon, 1982).

Estas formas potenciales de infección explican el carácter ocupacional de la esporotricosis, la cual se presenta sobre todo en campesinos, cultivadores y vendedores de flores y plantas, cosechadores, transportistas y vendedores de frutas, taladores y cazadores, entre otros. Ocasionalmente se han observado brotes de esporotricosis en los que varios miembros de una misma familia fueron afectados;

las fuentes de infección se adscribieron en un brote a una bugambilia en la que crecía el hongo (Bonifaz, 1990) y a una tienda de campaña contaminada en el otro (Arenas, comunicación personal). Los sueros de los tres miembros de esta última familia afectada se incluyen en este trabajo. También se han observado importantes epidemias ocupacionales como la que tuvo lugar en Transvaal, Sudáfrica entre 1927 y 1947 y que afectó a casi 3,000 mineros que se infectaron con el hongo que se desarrollaba en condiciones óptimas en las vigas de soporte de la mina (Lurie, 1963). En México, se han descrito igualmente epidemias en grupos de alfareros que empleaban paja para embalar sus productos terminadas, o en personas relacionadas con la colecta y elaboración de canastas o sombreros de paja (Rippon, 1982). Recientemente, se registró la epidemia más importante que ha tenido lugar en Estados Unidos con un total de 84 casos en 15 estados; los pacientes adquirieron la infección al manipular al musgo *Sphagnum*, con el hongo asociado, empleado para envolver las raíces de plántulas que se sembraron durante un programa anual de reforestación (Dixon y col., 1991).

La mayor parte de los autores coinciden en señalar que la esporotricosis afecta igualmente a hombres y mujeres y que al parecer la edad, tampoco parece influir en la frecuencia de esta enfermedad, dado que se han observado casos desde un niño de dos días de nacido hasta en sujetos que superan los 80 años de edad.

Los conidios o fragmentos miceliales adquiridos por cualquiera de las vías antes mencionadas, se transforman en el organismo en levaduras, que es la forma patogénica del hongo, que prolifera en el tejido del paciente. *Sporothrix schenckii* es una de las cinco especies de hongos con importancia médica que muestran dimorfismo como resultado de la adaptación a las nuevas condiciones de crecimiento impuestas por el organismo infectado. Como es de esperar, cambios en

la composición y fisiología celular acompañan al dimorfismo. Así por ejemplo en *S. schenckii*, la composición de la pared celular del núcleo y conidios son similares, mientras que la misma estructura en las levaduras, posee un mayor contenido de carbohidratos entre los que destaca la L-ramnosa poco común en hongos (San-Blas, 1982). Este carbohidrato se encuentra en complejos con manosa o como peptidoramnomananas y en estudios preliminares, este complejo fué serologicamente activo sólo en pacientes con esporotricosis (Lloyd, 1971). Esta y otras comparaciones, realizadas no sólo con *S. schenckii* sino también con otras especies dimórficas, han mostrado a la fase de levadura como una fuente importante de moléculas hacia las cuales se genera respuesta inmunitaria (San-Blas, 1982; Kite, 1979).

Como se mencionó al principio, la esporotricosis es generalmente un padecimiento cutáneo, pero en ocasiones se presenta en forma extracutánea que afecta articulaciones, huesos, vísceras (Wilson y col., 1967) meninges (Scott y col., 1987) y pulmones (Berson y Brandt, 1977). Debido al polimorfismo de esta infección, se han propuesto varias clasificaciones clínicas. En este trabajo se usará la clasificación adoptada por Rafal y Rasmussen (1991).

La esporotricosis puede ser dividida en cutánea y extracutánea (Figura 2). La forma cutánea comprende tres tipos: el linfagítico (llamado también linfático-cutáneo o linfocutáneo), el tipo fijo y el cutáneo disseminado.

En la esporotricosis linfagítica (75 a 80% de los casos), se desarrolla como reacción primaria, en el sitio de la inoculación, un nódulo subcutáneo indoloro, no adherido al tejido subyacente, que durante su curso penetra la piel y se vuelve necrótico y forma el llamado chancro esporotricótico. En los casos crónicos, los vasos linfáticos del área se afectan y forman una cadena o cordón de nódulos,

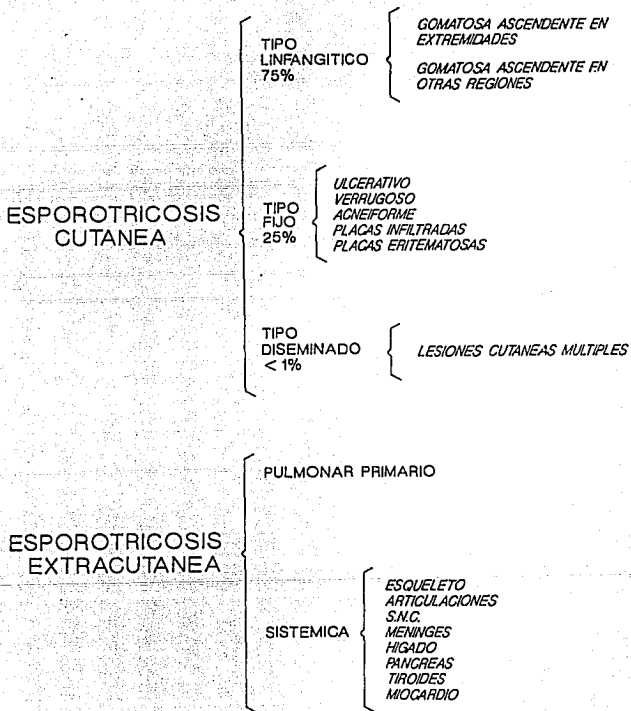


Fig. 2. Clasificación de las formas clínicas de la esporotricosis (basada en Rafal y Rasmussen, 1991)

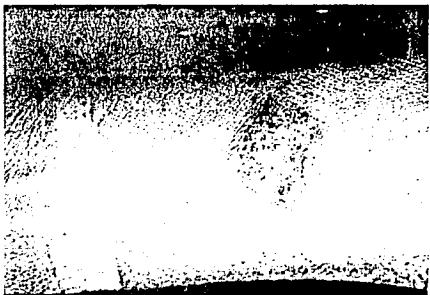
similares a la lesión original, que pueden implantarse y supurar al ulcerarse (Figura 3A).

En el tipo cutáneo fijo, que comprende aproximadamente el 25% de los casos de esporotricosis, el hongo permanece localizado en el sitio de la inoculación y no muestra avance, provoca lesiones que se manifiestan como formas ulceradas, acneiformes infiltradas, como placas eritematoides o escamosas, las cuales no afectan a los linfáticos locales. En esta forma cutánea de la esporotricosis se ha observado ocasionalmente la desaparición espontánea de las lesiones. Los sitios más comunes para la forma fija son la cara, los brazos, el cuello y el tronco (Figura 3B). Lavalley y Mariat (1983) al igual que Rippon (1982), consideran a este tipo clínico de la micosis como una forma de reinfección, basados en la observación de que un número significativo de personas de una población endémica, a las que generalmente pertenecen los pacientes con el padecimiento cutáneo fijo, dan respuestas de hipersensibilidad retardada a antígenos de *S. schenckii*.

El último tipo corresponde a la esporotricosis cutánea diseminada, en la que aparentemente no hay afección sistémica. Esta forma se registra en la literatura general con una frecuencia menor al 1% (Rippon, 1982; Wilson y col., 1967; Lurie, 1963). Sin embargo, en México se ha observado repetidamente casos que podrían clasificarse como de este tipo (Arenas y col. En prensa). Los pacientes con esporotricosis cutánea diseminada presentan varias lesiones en la piel como posible producto de inoculaciones iniciales múltiples, autoinoculación o diseminación por ruta hematológica (Figura 3C). A pesar de que estos casos presentan múltiples lesiones cutáneas (hasta 40 en una ama de casa cuyos sueros se incluyen en este estudio) no hay ni mal estado general ni tampoco afección sistémica detectable.



A



B

Fig. 3. Tipos clínicos de la esporotricosis cutánea. A. Linfocutánea o linfangítica. Múltiples nódulos subcutáneos se desarrollan a lo largo de los linfáticos que drenan el área. Constituye la forma más frecuente de la infección. B. Cutánea fija. El hongo se encuentra restringido al sitio de la inoculación. C. Cutáneo diseminado sin afección sistémica. Los pacientes muestran lesiones múltiples en todo el cuerpo.



C

Una característica importante que exhiben los pacientes con esporotricosis cutánea diseminada, a diferencia de aquellos con el padecimiento sistémico diseminado (forma extracutánea) es su excelente respuesta al tratamiento con solución saturada de yoduro de potasio (SSKI) por vía oral (Arenas y col., en prensa) que resulta prácticamente específico en el tratamiento de la esporotricosis (Conant, 1972).

La resistencia natural a la esporotricosis parece ser muy alta y dado que el hongo esta mundialmente distribuido, distintos factores que la sola exposición al hongo, deben ser importantes en las áreas donde la enfermedad prevalece. Las bases biológicas que expliquen por qué la esporotricosis es adquirida y aún más curse hacia alguna forma clínica particular, ya sea cutánea o extracutánea, así como su severidad, no son totalmente conocidas. La información hasta ahora disponible, se refiere principalmente a las formas de esporotricosis extracutánea considerada como una micosis oportunista dado que afecta a sujetos que presentan algún grado de inmunosupresión; se han registrado casos pulmonares primarios en alcohólicos crónicos, diseminación muscular en mujeres embarazadas, diabéticos o pacientes con linfomas y formas artríticas severas en pacientes con SIDA (Fitzpatrick y Eubanks, 1988) o en sujetos bajo tratamiento con cortisona (Manhart y Wilson, 1970; Molstud y Strom, 1978; citados por Rippon, 1982). Se ha demostrado que las deficiencias en la respuesta inmune mediada por células se asocian al desarrollo de la esporotricosis extracutánea (Plouffe y Silva, 1979; Meléndez y col., 1983). En estos estudios los pacientes con esporotricosis cutánea linfagítica mostraron inmunidad celular comparable a la de los sujetos sanos control a diferencia de los pacientes con esporotricosis

extracutánea que presentaron anomalías en su respuesta celular ².

El porqué *S. schenckii* puede causar padecimientos cutáneos de tipo linfagítico, fijo o bien diseminado requiere otro tipo de explicaciones ya que como se ha anotado, los pacientes son inmunocompetentes. Varios padecimientos causados no sólo por hongos sino también por bacterias o parásitos, plantean preguntas semejantes. Así por ejemplo, en la leishmaniasis experimental en ratones se ha propuesto como explicación para el desarrollo de una forma cutánea o una forma diseminada sistémica, la diferenciación de las células T_H (Linfocitos T de ayuda; $CD4^+$) hacia el tipo T_{H1} o T_{H2} . Esta diferenciación es dirigida por células presentadoras de antígeno, densidad del antígeno, interleucinas, hormonas y demás factores reguladores (Mossman y Moore, 1991). En este modelo, en la cepa de ratones Balb/c se genera una respuesta tipo T_{H2} y se desarrolla en consecuencia una leishmaniasis diseminada sistémica. En contraste en la cepa C3H/He la infección permanece cutánea, sin diseminación, e incluso los ratones sanan sin ningún tipo de tratamiento, se desarrolla una respuesta tipo T_{H1} . La diferenciación hacia células T_{H2} favorece una respuesta inmune humoral que se propone como la más importante para el control de organismos extracelulares y sus productos de secreción, mientras que cuando hay predominancia de linfocitos T_{H1} se favorece una respuesta inmune mediada por células, que potencia la destrucción de las células infectadas por el parásito intracelular, como lo es la *Leishmania*, lo que impide su diseminación hacia órganos internos. Los patrones de secreción de linfocinas en estos dos tipos de células T_H que explican el tipo de

² La inmunidad celular fue evaluada mediante la estimulación de linfocitos T periféricos con mitógenos, con antígenos de *Candida* y *S. schenckii*, así como por pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada (DTH) a PPD, candidina y estreptocinasa-estreptodomasia (Plouffe y Silva, 1979).

respuesta inmune efectora, son diferentes y mutuamente excluyentes y polariza el desarrollo de la infección; una respuesta T_H1 cuya linfocina determinante es el interferón gamma (IFN-gamma), inhibe una respuesta T_H2 (como se mencionó, típicamente una elevación en la producción de anticuerpos y en especial IgE), mientras que una respuesta preferente hacia el tipo T_H2 , inhibe la producción de IFN-gamma y abate la diferenciación de los linfocitos T_H a células con fenotipo T_H1 así impide una respuesta inmune celular (Chatelain y col., 1992). Recientemente ha sido reportada la existencia de clonas de células T_H con perfiles de secreción tipo T_H1 o bien T_H2 en seres humanos (Romagnani, 1991; Maggi y col., 1992) sin embargo aún no se ha demostrado el papel que juegan estas subpoblaciones celulares en cuanto al tipo y severidad de alguna infección, tal como lo ha sido en el modelo de leishmaniasis antes mencionado.

La lepra es otra infección que al igual que la esporotricosis, muestra distintas formas clínicas de las cuales la tuberculoide y la lepromatosa, representan formas polares de este padecimiento. Los factores que determinan la evolución de la infección hacia una forma tuberculoide más benigna y comunmente auto limitada, o a una lepromatosa más seria y progresiva en un individuo dado son desconocidas, sin embargo, varios estudios sugieren que el desarrollo de alguna de las formas clínicas, depende del grado de la respuesta inmune mediada por células y en consecuencia las formas clínicas tuberculoide y lepromatosa representan puntos antipodales de la misma (Bullock y Fasal, 1971).

En la esporotricosis, se han considerado varios factores para explicar su polimorfismo clínico. Así, la capacidad de diferentes cepas de *Sporothrix schenckii* de crecer a diferentes temperaturas (Kwon-Chung, 1979) podría tener relación con el tipo de lesiones producidas. Se ha observado que los conidios obtenidos de

lesiones linfocutáneas o extracutáneas, pueden formar colonias miceliales a 35°C o a 37°C, a diferencia de los conidios provenientes de lesiones cutáneas fijas, que sólo pueden formar micelio a 35°C. Cuando los conidios provenientes de los aislados que crecen a 37°C son inoculados por vía intraperitoneal a ratones, se obtiene multiplicación de la forma levaduriforme del hongo en los órganos internos. En contraste, al inocular conidios procedentes de aislados que no crecen a 37°C, no se encuentra proliferación de levaduras en órganos internos, salvo en testículos que presentan una menor temperatura que el resto del organismo. A partir de estos hallazgos se postula que el crecimiento de estos últimos aislados en tejidos con temperaturas mayores a 35°C es tan lento, que el sistema inmunitario elimina al hongo exitosamente y evita su diseminación. La infección podría ser entonces, un proceso selectivo para aquellos aislados capaces de crecer a 35°C o a temperaturas superiores lo que determina, posiblemente, la forma y severidad de la esporotricosis. Por otra parte, también se ha postulado que existen diferencias en el potencial patogénico de los aislados obtenidos directamente de la naturaleza y de aquellos provenientes de casos de esporotricosis humana (Howard y Orr, 1963; citados por Rippon, 1982). Streton y Dart (Citados por Rippon, 1982) han encontrado diferencias significativas en el contenido de lípidos de ambos tipos de aislados. También una relación entre virulencia y la composición lipídica ha sido sugerida para otros hongos, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis* entre ellos (Rippon, 1982). Mariat (citado por Rippon, 1982) considera que tanto el estado nutricional como la exposición repetida al hongo, pueden ser de gran importancia en la mayoría de los pacientes que contraen la enfermedad. De tal forma, muchos casos de esporotricosis linfocutánea son contraídos por sujetos mal nutridos, de zonas rurales pobres, que están en contacto directo con el suelo y en

consecuencia con el hongo. Con respecto al desarrollo y severidad del tipo cutáneo fijo de la esporotricosis, algunos autores consideran que el carácter localizado propio de esta forma, es producto de la inmunidad del individuo infectado, el cual presumiblemente tuvo contactos anteriores con *S. schenckii* (González-Ochoa, 1954; Rippon, 1982; Lavalley y Mariat, 1983).

Salvo el cuadro clínico de la esporotricosis cutánea linfangítica, que es tan constante y permite el diagnóstico acertado por el especialista, deben ser consideradas para el diagnóstico diferencial otras micosis como cromoblastomicosis, blastomicosis o micetoma entre otras, así como casos de tuberculosis cutánea o sífilis gomataosa que desarrollan aspectos clínicos similares a las otras formas cutáneas de la esporotricosis (Rippon, 1982).

En la esporotricosis cutánea el exámen microscópico de pus o tejidos, aún empleando técnicas de tinción especiales como la de Gomori (GMS), el método de Hodkiss- MacManus (PAS) o la inmunofluorescencia, no revela al hongo en todos los pacientes (Rippon, 1982; Evans y Richardson, 1989). Bonifaz (1990) reporta que de 80 casos de esporotricosis examinados por inmunofluorescencia, sólo en 2 se observaron estructuras en forma de "puro" o "navecilla". Por lo anterior, estas técnicas se consideran de poco o ningún valor diagnóstico en los casos cutáneos y además, la obtención de biopsias es poco recomendable dado que puede causar la infección de tejidos más profundos o incluso propiciar la diseminación hematógena del hongo.

En la actualidad, se considera al cultivo de *S. schenckii* a partir de las lesiones, como el método más confiable para el diagnóstico de la esporotricosis. Este se realiza fácilmente en medios como el Sabouraud adicionado con cicloheximida y cloramfenicol a temperatura ambiente para obtener la forma micelial, y en BHI-

sangre a 37° C para obtener la levadura demostrando el dimorfismo.

El diagnóstico mediante pruebas serológicas cobra gran importancia sobre todo en aquellos casos donde el hongo no puede ser aislado, como sucede para algunas formas extracutáneas de la esporotricosis tal como la meningitis. La inmunodifusión, la inmunoelectroforesis, la fijación del complemento y la aglutinación de levaduras o de partículas de látex recubiertas con antígeno, han sido empleadas para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Por medio de inmunodifusión y de inmunoelectroforesis por ejemplo, se han demostrado anticuerpos precipitantes específicos en contra de antígenos del hongo (Albornoz y col., 1984). En un estudio comparativo de la inmunodifusión, la fijación de complemento y la aglutinación para la detección de anticuerpos reactivos con *S. schenckii* se concluyó que la aglutinación de levaduras o de partículas de látex recubiertas con el antígeno son las más apropiadas para el diagnóstico. En este estudio se encontró que el tipo de medio de cultivo en el cual se desarrollaron las levaduras o la fase de crecimiento de la cual se recuperaron, no tienen un efecto significativo sobre su antigenicidad. Además, no se observó aglutinación de las levaduras con antisueros de pacientes con histoplasmosis, blastomicosis, criptococosis, coccidioidomicosis y candidiasis (Karlin y Nielsen, 1970).

Otros métodos como el ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) y más recientemente la inmunotransferencia (Western immunoblot) la cual permite el análisis de la respuesta serológica hacia mezclas complejas de antígenos, han sido empleados para establecer el diagnóstico de la esporotricosis. Scott y col. (1987) usaron antígenos obtenidos del sobrenadante de un cultivo líquido de la levadura de *S. schenckii* y pudieron demostrar por ELISA, anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo y suero de pacientes que presentaban meningitis crónica, cuya

causa no se había podido establecer. Tales resultados permitieron identificar a *S. schenckii* como el agente etiológico, lo cual pudo confirmarse mediante el cultivo del hongo a partir del líquido cefalorraquídeo. Los autores concluyeron que este ELISA permite el diagnóstico temprano de la esporotricosis que afecta el sistema nervioso central, así como la pronta iniciación de la terapia adecuada brindando un mejor pronóstico. En un segundo reporte (Scott y Muchmore, 1989) con el empleo del mismo ELISA, demostraron anticuerpos en sueros de pacientes con las formas linfagítica y con títulos más altos, en aquellos con formas extracutáneas de la esporotricosis. En el análisis por inmunotransferencia, sólo las muestras provenientes de pacientes con esporotricosis extracutánea, reconocieron un mayor número de antígenos y en un margen más amplio de pesos moleculares. De estos perfiles de reactividad se sugieren incluso 2 bandas como marcadores diagnósticos de casos extracutáneos.

Con el objeto de lograr una mejor comprensión de los factores que determinan el desarrollo de las diferentes formas de la esporotricosis cutánea, iniciamos la caracterización de la respuesta inmune inducida por *Sporothrix schenckii*, mediante el empleo de sueros provenientes de casos de esporotricosis linfocutánea, cutánea fija y cutánea diseminada. En este trabajo, se reporta una comparación de la especificidad antigénica de los anticuerpos en el suero de estos pacientes, co base en una preparación de exoantígenos de la levadura y las técnicas de ELISA e inmunoelectrotransferencia.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVO DE *S. schenckii*

Los aislados de *Sporothrix schenckii* que se utilizaron en el estudio se obtuvieron de un paciente con esporotricosis cutánea atendido en el Departamento de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" dependiente de la Secretaría de Salud (S.S.A.).

Los cultivos iniciales se verificaron por la morfología típica de la colonia y la apariencia microscópica de los cultivos en laminilla.

Se procedió a la resiembra de los aislados originales en tubo inclinado con agar-glucosa de Sabouraud (Conant y col., 1972) adicionado con cloramfenicol (0.05mg/ml) y cicloheximida (0.5mg/ml). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la aparición de las colonias.

Para el cultivo en laminilla (Evans y Richardson, 1989), se colocó un bloque de medio Sabouraud y antibióticos inoculado con esporas y fragmentos miceliales, entre un porta y un cubreobjetos en una cámara húmeda para su incubación a temperatura ambiente por espacio de siete días. Pasado este tiempo y al advertir la adherencia del

micelio, el cubreobjetos se retiró para su montaje con lugol y posterior análisis por microscopía de luz y fotografía.

TRANSFORMACION A LEVADURA

Para la transformación del micelio a levadura, fase tisular del hongo, se sembraron fragmentos miceliales y esporas tomados de la zona marginal de una colonia del cultivo original, en tubo inclinado que contenía medio agar-BHI (DIFCO laboratories, Detroit, Michigan, USA.) suplementado con 6% de sangre total de conejo, cisteína 0.1%, glucosa 2% y 20 U de penicilina, 40 µg de estreptomina por mililitro y cicloheximida y cloramfenicol como se ha mencionado. Una vez obtenidas las colonias en los cultivos mantenidos a 37°C, las células se resembraron semanalmente en medio BHI-agar-cisteína-glucosa y antibióticos. Se verificó la transformación a levadura, y se observaron muestras de las colonias resultantes al microscopio de luz. Algunas preparaciones se tiñeron según la técnica de Gramm (Balows y Hausler, 1981).

SUEROS.

Los sueros empleados en este trabajo se obtuvieron de pacientes con esporotricosis atendidos en el Departamento de Dermatología del Hospital General "Manuel Gea González" de la Secretaría de Salud (TABLA 1). La muestra total constó de 15 sueros de 10 pacientes con esporotricosis cutánea demostrada por cultivo y esporotricina positiva, y con tiempos de evolución que van desde un mes hasta aproximadamente los 25 años. Algunas de las muestras corresponden al mismo paciente en distintas etapas de tratamiento.

TABLA I
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES CON
ESPOROTRICOSIS CUTÁNEA

MUESTRA	SEXO	EDAD	FORMA CLÍNICA	TIEMPO DE EVOLUCION (MESES)	DTH* (cm)
1	M	61	Linfangítica	300	2.5
2	M	37	Linfangítica	1	3
3	M	36	Linfangítica	2	NR
4	M	37	Linfangítica	1	NR
5	F	23	Diseminada	3	3
6	M	35	Diseminada	1	1
7	F	31	Diseminada	1	8
8	M	7	Diseminada	1	6
9	M	49	Fija	210	NR
10	M	68	Fija	2	3

* Reacción a la esporotricina intradérmica.

NR No realizada.

Se incluyeron en este análisis cuatro sueros de pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y dos más del Instituto Nacional de la Nutrición (INN) que presentaron histoplasmosis pulmonar con altos títulos de anticuerpos reactivos con antígenos de *Histoplasma capsulatum* por ELISA, así como 12 sueros de individuos sanos.

AGLUTINACION DIRECTA

Con objeto de obtener el título de anticuerpos en contra de la levadura de *S. schenckii* de todos los sueros, se practicó la aglutinación de levaduras (Karlin y Nielsen, 1970; Palmer y col., 1977; Evans y Richardson, 1989).

La suspensión de las levaduras para este ensayo se preparó a partir de células de cultivos de 72 horas en medio agar BHI-cisteína-glucosa y antibióticos mantenidos a 37°C. Las levaduras se lavaron tres veces se resuspendieron cada vez con amortiguador de fosfatos salino (pH 7.2) y Thimerosal 1:5000 (PBS-Thimerosal) y se centrifugaron a 250 x g por 10 minutos a 4°C. El botón final se resuspendió en PBS-thimerosal a la dilución adecuada que se determinó por el proceso convencional de diluciones dobles seriadas del antígeno (levaduras) y el antisuero. Se evaluaron 4 diluciones de las levaduras en un margen de 1:500 a 1:4,000 sobre diluciones de 1:4 a 1:4,096 de tres sueros de pacientes con esporotricosis y tres pertenecientes a individuos sanos.

Todos los ensayos de aglutinación para obtener el título de todos los sueros, se realizaron en placas de 96 pozos de fondo plano (Micro Test II Tissue Culture Plate Cat. No. 3040, Falcon) en un volumen total de 200 µl por pozo; 100 µl correspondientes a la dilución correspondiente del suero en PBS (pH 7.2) y 100 µl de la suspensión de

levaduras. Después de mezclar levaduras y sueros por 30 minutos en un agitador orbital, las placas se mantuvieron en refrigeración (4° C) toda la noche y se centrifugaron a 250 x g por 10 minutos a 4°C . Los títulos de aglutinación se registraron como el recíproco de la dilución más alta del suero que produjera agregados bien formados de las levaduras, al observar a bajo aumento con ayuda del microscopio invertido.

PREPARACION DE EXOANTIGENOS DE LA LEVADURA DE *Sporothrix schenckii*

Se siguió el protocolo empleado por Scott y Muchmore (1989) para la obtención de exoantígenos de la fase levaduriforme de *S. schenckii*.

Las levaduras obtenidas de cultivos de 48 horas en BHI-agar se lavaron tres veces con PBS (pH 7.2) y se centrifugaron como se ha manejado. El botón final se resuspendió en medio BHI para inocular un tubo de 50 ml (Cat. 25330. Corning N.Y.) que contenía 20 ml de medio BHI y antibióticos. Este cultivo se mantuvo a 37°C con agitación orbital (100 rpm), por espacio de 48 horas, después de las cuales, el tubo se centrifugó a 250 x g por 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en PBS (pH 7.2) para inocular 200 ml de medio YCG contenido en un matríz Erlenmeyer de un litro. Después de su incubación por tres días en un agitador orbital (100 rpm) a 37°C, el cultivo se transfirió a tubos nuevos para recuperar las levaduras por centrifugación como se ha indicado. El paquete celular se resuspendió en PBS y se empleó para inocular 3 litros de medio YCG que se incubó por siete días como anteriormente. Pasado este periodo, los cultivos se mantuvieron en un baño de agua a 62° C por tres horas con objeto de causar la muerte celular. Se mantuvo a temperatura ambiente por

espacio de 48 horas y posteriormente, las levaduras se eliminaron por centrifugación a 5,000 x g durante una hora a 4° C. El sobrenadante final se filtró (Papel Whatman No. 1), y se añadió thimerosal a una concentración final de 1:5,000.

Esta preparación que contiene los exoantígenos de la levadura de *S. schenckii*, se dializó contra agua destilada (tres cambios en 48 horas, membrana Spectrapor 2, 12,000-14,000 MwCo), se liofilizó y almacenó a -70° C.

DETERMINACION DE PROTEINAS

Una muestra del material liofilizado se resuspendió en agua destilada y desionizada, y se centrifugó a 16,000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de proteína en el sobrenadante recuperado, se determinó según ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay Kit cat. 500-0001) basado en la técnica descrita por Bradford (1976). La curva patrón se construyó con gamma globulina de plasma bovino.

ELISA

Se determinaron, la concentración adecuada del exoantígeno de *S. schenckii* y la dilución óptima del conjugado (peroxidasa acoplada a anti-Ig humana total) según se ha propuesto (Voller y Bidwell, 1986) para obtener el título de anticuerpos de todos los sueros por la técnica de ELISA.

Se evaluaron dos placas de soporte distintas, Immulon I e Immulon II (Cat. 011-010-6301 y 011-010-6302, Dynatech Laboratories, Inc). Los pozos se cubrieron por 18 horas en refrigeración, con distintas concentraciones 1, 5, 10, 50 y 100 µg de proteína del

exoantígeno resuspendido en PBS (pH 7.2). Después de tres lavados con PBS-Tween 20 (0.05%) tres minutos cada vez, los pozos se bloquearon con BSA al 3% y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Posterior a una serie de lavados como se ha indicado, se adicionaron a cada pozo 100 μ l de una dilución 1:100 en PBS-Tween 20-BSA (1 mg/ml) del suero. En este ensayo se usaron 2 sueros de pacientes con esporotricosis que presentaron altos títulos de aglutinación de levaduras, y un suero perteneciente a un individuo sano. Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente y lavados, se añadieron a cada pozo 100 μ l de una dilución 1:1,000 en PBS-Tween del conjugado (peroxidasa acoplada a anti-Ig humana total; Cooper Biomedical). Después de su incubación a temperatura ambiente por dos horas y una serie de lavados como se ha indicado, se añadieron a cada pozo 100 μ l del sustrato OPD (o-fenilendiamina 0.4 mg/ml en amortiguador 0.05 M de fosfato-citrato pH 5.0 más 40 μ l de peróxido de hidrógeno 30% por 100 ml de la solución amortiguador-sustrato). La reacción se detuvo al adicionar a cada pozo, 50 μ l de HCl 3N a los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. La absorbencia de la OPD se leyó a 492 nm en un lector de ELISA (ELISA Microreader, Bio-Rad).

Se realizó un segundo ensayo para determinar la dilución adecuada del conjugado antioglobulina humana. Para tal, las placas de soporte se cubrieron con el antígeno en PBS como se indicó. Después del bloqueo y los lavados, se añadieron a los pozos correspondientes, diluciones dobles seriadas, comprendidas en un margen de 1:20 a 1:10,240, de los sueros de sujetos con esporotricosis y negativo ya manejados. Posterior a su incubación por espacio de 2 horas y lavados como se ha indicado, se evaluaron dos diluciones del conjugado anti-globulina, 1:1,000 y 1:2,000, por duplicado en cada suero, al añadir 100 μ l de la dilución correspondiente a cada pozo. Se incubó y lavó como se ha manejado para añadir el sustrato. La reacción se detuvo y la absorbencia se

leyó como en el caso anterior.

Una vez definidas las condiciones de trabajo adecuadas (placas de soporte, concentración de antígeno, dilución del conjugado y el tiempo de reacción enzimática) las cuales mostraron una mayor resolución entre pacientes e individuos sanos, se obtuvo el título de todos los sueros.

En cada placa de titulación se incluyeron un suero positivo y tres negativos pertenecientes a individuos sanos. Se incluyeron pozos control cubiertos solamente con BSA y medio YCG.

Para calcular los resultados se definió el punto de corte al calcular la media aritmética de la densidad óptica (DO) por cada dilución de los sueros negativos y sumar 2 desviaciones estándar (SD). El título se consideró como la última dilución que mostrara una DO superior a la marcada como punto de corte por los sueros negativos en la misma serie de diluciones.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Con objeto de determinar la concentración adecuada de proteína del antígeno de *S. schenckii* que permitiera una buena resolución de sus componentes y asegurara una cantidad adecuada para los ensayos de inmunotransferencia, se evaluaron 6 concentraciones de 10 a 60 µg de proteína total por pozo, se empleó el sistema de electroforesis en placa vertical Mini-Protean II (cat. 165-2940, Bio-Rad, Richmond, CA).

El antígeno liofilizado se solubilizó en condiciones reductoras en amortiguador de carga (Glicerol 10%, SDS 4%, Tris 2M pH 6.8 0.5%, pironina 0.02% y β-mercaptoetanol o DTT 2M en Tris 0.1M (pH 6.8) al 5%), se hirvió por 5 minutos y centrifugó a 16,000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenanante

resultante se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 10% preparado de acuerdo con Laemmli (1970). El gel se corrió a 7 mAmp el gel superior (concentrador) y a 14 mAmp el inferior (separador). Se incluyeron en cada corrida como marcadores de peso molecular: α -lactalbúmina, 14,400; inhibidor de tripsina, 20,100; anhidrasa carbónica 30,000; ovoalbúmina 67,000 y fosforilasa B, 94,000 (Pharmacia Inc, Piscataway, N. J.).

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (ácido acético 7.5%, isopropanol 25% y Coomassie R-250) o plata (Bio-Rad Silver Stain Kit. Cat. 161-0443) o bien se procesaron para inmunotransferencia (Western immunoblot).

INMUNOTRANSFERENCIA

Los polipéptidos resultantes de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa (poro 0.45 μ m. Cat. 21640, Schleicher & Schuell, Keene, NH.) en cámara de transferencia (Idea Scientific, Co., Corvallis, Oregon) con electrodos de placa y buffer de transferencia (Tris 0.24 M, glicina 0.192 M y Metanol 20%. Towbin y col., 1979), por 30 minutos a 15 Volts. El gel de poliacrilamida y una muestra del papel de nitrocelulosa que contenía los marcadores de peso molecular y los antígenos de *Sporothrix*, se tiñeron con azul de Coomassie (ácido acético 7.5%, isopropanol 25%, Coomassie R-250 0.025%) y negro de amido (Negro de amido 0.1%, metanol 45% y ácido acético 10%) respectivamente, para calcular los pesos moleculares y establecer la eficiencia en la transferencia. Para los ensayos de inmunotransferencia, las membranas de nitrocelulosa resultantes se lavaron por 30 minutos con PBS (pH 7.2) que contenía 0.3% de Tween-20 y se incubaron por una hora a temperatura ambiente con agitación, con PBS-Tween 20

(0.3%) y albúmina sérica bovina (BSA) al 3% con objeto de bloquear los sitios reactivos con proteína. Después de tres lavados, 10 minutos cada vez, con PBS-Tween 20, las membranas se cortaron a lo largo en tiras (0.5 cm de ancho) que se colocaron individualmente en charolas de incubación con el suero designado en dilución 1:100 en PBS-Tween 20 y BSA (3%). Después de su incubación por 2 horas con agitación a temperatura ambiente y lavados como se ha indicado, las tiras se incubaron con anti-Ig humana ligada a peroxidasa (Code NA. 933, Amersham UK) en dilución 1:500 en PBS-Tween-BSA (3%) por 2 horas como anteriormente. Posterior a tres lavados con PBS-Tween 20 y tres más con PBS solo, las membranas se revelaron con una solución del sustrato o-cloronaftol (2 ml de o-cloronaftol (3 mg/ml en metanol) y 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30% por cada 10 ml de PBS). Al obtenerse un máximo de coloración con un fondo mínimo, la reacción se detuvo al enjuagar exhaustivamente las tiras con agua destilada. Las membranas se secaron sobre papel filtro y se fotografiaron para su análisis.

OXIDACION DEL ANTIGENO DE *S. schenckii* CON PERYODATO EN INMUNOTRANSFERENCIA

Con objeto de determinar si los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes son específicos para determinantes antigénicos carbohidratos, se empleó el método de la oxidación con peryodato, en la técnica de inmunotransferencia, descrito por Woodward y col. (1985).

Después de la electroforesis y transferencia del exoantígeno de *S. schenckii*, como se ha indicado, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon toda la noche con BSA al 3% en PBS-Tween 20 con agitación, y en frío (4°C). Después de lavar tres veces con

amortiguador de acetatos 50 mM (pH 4.5), la nitrocelulosa se cortó en tiras. Un grupo de éstas, marcadas como experimentales, se incubaron con 5 mM de peryodato de sodio en amortiguador de acetatos y otro con 10 mM del mismo. El grupo control, no se expuso a la acción del peryodato. Posterior a su incubación a temperatura ambiente en la oscuridad por una hora, las membranas se lavaron tres veces nuevamente con buffer de acetatos y se bloquearon con glicina al 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.5) durante toda la noche a 4° C con agitación. Las tiras se lavaron tres veces más, 10 minutos cada vez, con PBS-Tween 20 (0.3 %), y se colocaron en charolas de incubación de tal forma que una tira de cada tipo (control, 5 mM y 10 mM de peryodato de Na) se evaluó con cada uno de los sueros. De esta forma las membranas se incubaron con el suero correspondiente en dilución 1:100 en PBS-Tween 20-BSA (3%) durante una hora con agitación a temperatura ambiente. Después de tres lavados tres veces con PBS-Tween, las tiras se revelaron como se ha descrito.

RESULTADOS

Cultivo de *Sporothrix schenckii*

Después de una semana de cultivo, a temperatura ambiente en agar-glucosa de Sabouraud, las colonias de *S. schenckii* fueron pequeñas y blancas. Conforme aumentó su tamaño, la superficie de la colonia se observó húmeda, rugosa y membranosa. El color de las colonias del aislado que se empleó en este estudio fue blanco amarillento aún en cultivos viejos, a diferencia de otros cultivos provenientes de diferentes aislados que fueron mantenidos paralelamente, que tornaron del amarillento al negro, sobre todo en la parte central de la colonia, conforme avanzaba su desarrollo (Figura 4).

Debido a que en una preparación típica no es posible reconocer las características esenciales para la identificación microscópica de *S. schenckii*, dado que se provoca el desprendimiento de las esporas, existió la necesidad de realizar cultivos en laminilla. Al cabo de una semana de incubación a temperatura ambiente, el examen microscópico de la preparación mostró el micelio constituido por hifas finas soportando conidios que crecen directamente de él (radulosporas) o bien sobre hifas

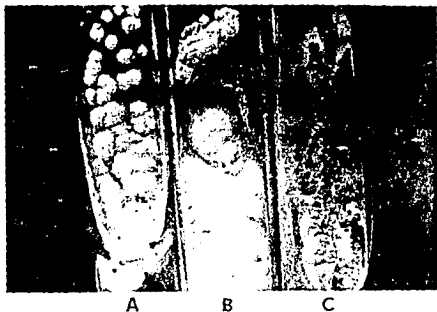


Fig. 4. Morfología de las colonias miceliales de S. schenckii en agar glucosa de Sabouraud a 25 C. Algunos aislados mostraron pigmentación conforme la edad del cultivo avanzó (B y C) a diferencia del empleado en este trabajo (A) que no mostró pigmentación a lo largo del cultivo.

portadoras (simpodulosporas) que conforman las estructuras de "racimo" o "margarita" características de la especie (Figura 5).

Como se mencionó con anterioridad *Sporothrix schenckii* es un hongo dimórfico, y la demostración de este dimorfismo es importante para la identificación específica. Con este propósito se inocularon tubos con agar BHI-sangre con conidios y fragmentos miceliales de las colonias obtenidas en medio Sabouraud. Al cabo de una semana a 37 C se observaron claramente colonias blancas de bordes lisos. El análisis por microscopía de luz reveló que las colonias estaban compuestas por células en gemación ovals, redondeadas o en forma de "puro" similares a las reportadas en frotis procedentes de animales inoculados experimentalmente (Conant, 1972) (Figura 6). Estas levaduras son grampositivas (figura 7).

EXOANTIGENO DE LA LEVADURA DE *S. schenckii*.

Las levaduras se crecieron masivamente para preparar un antígeno soluble, según se describió en Materiales y Métodos. A partir de 3 litros de medio de cultivo se obtuvo un total de 420 mg de antígeno con un contenido de 17.7% de proteínas.

El análisis del exoantígeno de *S. schenckii* por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras, reveló un patrón de 9 bandas comprendidas en un intervalo de 16 a 67 kDa. Cuatro componentes de la preparación con pesos moleculares de 27, 30, 34 y 67 kDa, se encontraron en mayor proporción por tinción con azul de Coomassie R-250 o con plata. Estas dos tinciones revelaron exactamente el mismo perfil electroforético (Figura 8).

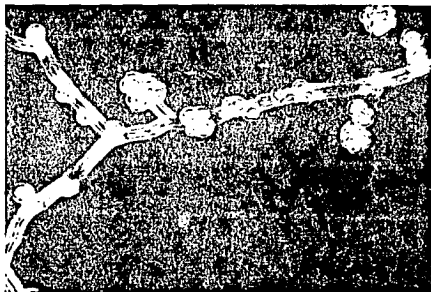


Fig. 5. Apariencia del micelio de S. schenckii en agar glucosa de Sabouraud a 25 C por microscopia de contraste de fase (900X).

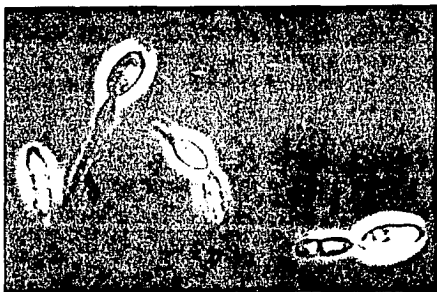


Fig. 6. Fotomicrografia en contraste de fase de la levadura de Sporothrix schenckii obtenida en medio BHI a 37 C, (900X).



Fig. 7. Tinción de Gram de las levaduras de Sporothrix schenckii (360X).

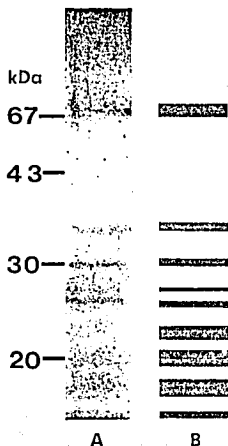


Fig. 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS del exoantígeno de la levadura de Sporothrix schenckii (A) y diagrama del mismo (B).

DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-*S. schenckii*.

Se determinaron los títulos de anticuerpos reactivos con *S. schenckii* para lo que se emplearon como antígenos la levadura total para ensayos de aglutinación directa y la preparación de exoantígenos de levaduras para el ensayo de ELISA.

Para la aglutinación directa, se determinó la concentración adecuada de levaduras al evaluar distintas diluciones de las mismas y de dos sueros de pacientes con esporotricosis. De las cuatro suspensiones de levaduras empleadas: 1:500, 1:1,000, 1:2,000 y 1:4,000 (vol/vol) la suspensión de 1:2,000 mostró los resultados más satisfactorios, dado que con las suspensiones más concentradas no fue posible obtener el título, mientras que con la de 1:4,000 se observó el fenómeno de prozona. Establecida la suspensión adecuada se obtuvo el título de anticuerpos aglutinantes de todos los sueros de pacientes con esporotricosis cutánea, pacientes con histoplasmosis pulmonar y de muestras provenientes de individuos sanos.

Los títulos de aglutininas encontrados en las muestras de los pacientes con esporotricosis van de 128 a 512 (Tabla II) con un título medio de 369.7. Los títulos más altos se observaron en los pacientes con el tipo linfagítico con 512, salvo una muestra del mismo grupo de pacientes que resultó con título de 128 obtenida de un caso linfagítico incipiente, así considerado por presentar sólo un nódulo subcutáneo, aparte del chancro de la lesión original a diferencia de los otros pacientes que mostraron mayor diseminación linfática. Todos los casos diseminados se agruparon con un título de 256. Las muestras de pacientes con el tipo fijo obtuvieron títulos de 512 y 256.

En los 6 sueros de pacientes con histoplasmosis pulmonar se encontraron aglutininas anti-*S. schenckii*. El intervalo de títulos para este grupo fue de 64 a 256 y un

TABLA II
 TITULO DE AGLUTINACION DE LEVADURAS
 EN PACIENTES CON ESPOROTRICOISIS CUTANEA

MUESTRA	FORMA CLINICA	TITULO*
1	Linfangítica	512
2	Linfangítica	512
3	Linfangítica	512
4	Linfangítica	128
5	Diseminada	256
6	Diseminada	256
7	Diseminada	256
8	Diseminada	256
9	Fija	512
10	Fija	256
Titulo medio =		369.7

* Recíproco de la dilución más alta que mostrara aglutinación franca.

título medio de 117.3 (Tabla III). Las muestras de 12 voluntarios sanos también mostraron anticuerpos aglutinantes en un intervalo de título de 16 a 128 y una media de 46.6, el menor en esta prueba serológica (Tabla IV).

En los ensayos de aglutinación de levaduras realizados con muestras sucesivas de algunos de los pacientes bajo tratamiento con solución saturada con yoduro de potasio o bien itraconazol, no se encontraron variaciones en el nivel de aglutininas con respecto a la primera muestra obtenida del paciente sin ningún tipo de tratamiento (Tabla V). Incluso en un caso con el padecimiento cutáneo diseminado, que mostró total recuperación un año después de iniciada la terapia, el título se mantuvo sin variación (Tabla V).

La preparación de antígenos a partir del cultivo de la levadura de *S. schenckii* descrita anteriormente, se empleó para obtener el título de anticuerpos reactivos de todos los sueros por el ensayo de ELISA. Para establecer las condiciones adecuadas se evaluaron diferentes tipos de placas de soporte, la concentración de antígeno y la dilución del conjugado anti-inmunoglobulina humana.

Se evaluaron las placas de soporte Immulon I y II cubiertas con 1, 5, 10, 50 y 100 µg de proteína total por pozo, con 2 sueros de pacientes con esporotricosis y uno más proveniente de un voluntario sano. En las placas de Immulon II la densidad óptica (DO) obtenida con el suero del individuo sano fue hasta 5 veces mayor que la lectura en las placas de Immulon I (Figura 9). En cambio, las lecturas para cada una de los sueros de los dos pacientes con esporotricosis no mostraron variación importante en los dos tipos de placas (Figura 9). Con base en estos resultados se eligieron las placas Immulon I y la concentración de 1 µg de proteína del antígeno de *Sporothrix* por pozo, las cuales mostraron mayor resolución entre los sueros de los pacientes y el proveniente del individuo sano.

TABLA III
TITULO DE AGLUTINACIÓN DE LEVADURAS EN
PACIENTES CON HISTOPLASMOSIS PULMONAR

PACIENTE ⁺	TITULO*
1	64
2	128
3	64
4	256
5	64
6	128
Titulo medio -	117.3

+ Presentan altos títulos de anticuerpos anti-*Histoplasma capsulatum* por ELISA

*** Recíproco de la dilución más alta que mostrara aglutinación franca.**

TABLA IV
TÍTULOS DE AGLUTINACION DE LEVADURAS
DE INDIVIDUOS SANOS

SUERO	TITULO*
1	16
2	16
3	128
4	32
5	32
6	16
7	32
8	16
9	64
10	64
11	16
12	128
Título medio =	46.6

*Recíproco de la dilución más alta del suero que mostrara aglutinación franca.

TABLA V
 TITULOS DE ANTICUERPOS ANTI- *Sporothrix schenckii*
 EN PACIENTES CON ESPOROTRICOSIS CUTANEA
 POR ELISA

MUESTRA	FORMA CLINICA	TITULO*
1	Linfangítica	6,400
2	Linfangítica	6,400
3	Linfangítica	6,400
4	Linfangítica	1,600
5	Diseminada	3,200
6	Diseminada	1,600
7	Diseminada	1,600
8	Diseminada	1,600
9	Fija	3,200
10	Fija	3,200

* Última dilución con lectura que excediera la absorbencia media (media + 2 D.S.) de los sueros de individuos sanos.

12 sueros pertenecientes a individuos sanos obtuvieron títulos <50

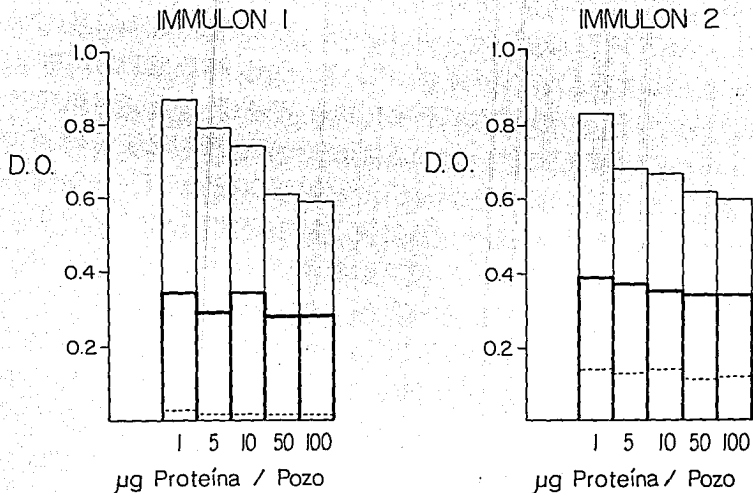


Fig. 9. Evaluación de las placas de soporte y concentración del exoantígeno de la levadura de *S. schenckii* para el ensayo de ELISA. Muestras de pacientes con esporotricosis cutánea (Barras con líneas delgadas, muestra 1 o gruesas, muestra 2). La muestra de un voluntario sano (Barras con líneas puntuadas) mostró una lectura 5 veces mayor en las placas Immulon 2. Pozos cubiertos con BSA o medio YCG resultaron con D.O. menores a 0.02.

Evaluadas las placas de soporte y la concentración del antígeno, se determinó la dilución del conjugado anti-inmunoglobulina humana más adecuada. De las diluciones 1:1,000 y 1:2,000 del conjugado ensayadas, la dilución 1:1,000 mostró los resultados más satisfactorios con una mayor diferencia entre los sueros de pacientes con esporotricosis y el control sano (Figura 10). Estos resultados permitieron establecer las condiciones óptimas para el ensayo de ELISA.

Los títulos más altos encontrados en los sueros fueron de 6,400 y correspondieron a los pacientes que presentaron el tipo clínico linfocutáneo, salvo una muestra de este grupo que resultó con un título de 1,600 perteneciente a un caso incipiente ya mencionado en los resultados de la aglutinación de levaduras. Tres de los pacientes con esporotricosis cutánea diseminada, provenientes de un brote familiar, se agruparon con un título de 1,600 y un cuarto suero resultó con 3200 (Tabla VI). Las 2 muestras de individuos con esporotricosis cutánea fija dieron un título de 3,200. No se encontraron títulos de anticuerpos anti-*S. schenckii* en 6 sueros obtenidos de casos de histoplasmosis pulmonar y que tenían altos títulos de anticuerpos anti-*H. capsulatum* (Tabla VII) ni en las 12 muestras de individuos sanos aún en diluciones de 1:50.

De 2 pacientes con el padecimiento linfocutáneo, de uno con el tipo cutáneo diseminado y de uno más con la forma fija se contó con muestras de suero obtenidas antes del tratamiento y en etapas sucesivas del mismo. Los títulos de anticuerpos, como sucedió también en el ensayo de aglutinación, no sufrieron modificación en ninguno de los casos y etapas (Tabla V).

INMUNOTRANSFERENCIA

En un ensayo preliminar se determinó la cantidad adecuada de antígeno para la

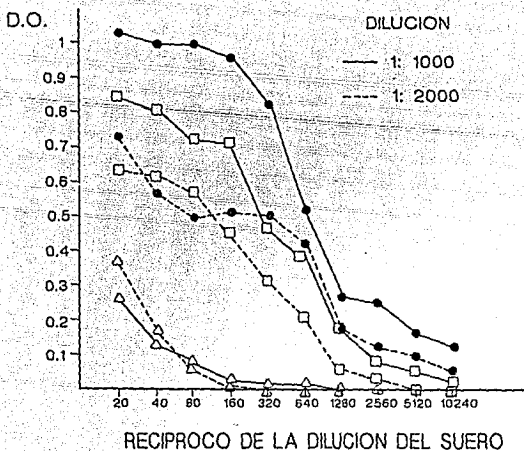


Fig. 10. Evaluación de 2 diluciones del conjugado anti-inmuno globulina humana para el ensayo de ELISA. Se emplearon sueros de 2 pacientes con esporotricosis (círculos o cuadros) así como una muestra de un individuo sano (triángulo). El suero control resulta con un bajo fondo (D.O. 0.05) a diluciones donde los sueros positivos dan lecturas mayores a 0.7 empleando la dilución 1:1,000 del conjugado.

TABLA VI

TITULO DE ANTICUERPOS ANTI- *Sporothrix schenckii*
EN PACIENTES CON HISTOPLASMOSIS PULMONAR
POR ELISA.

PACIENTE+	TITULO*
1	<50
2	<50
3	<50
4	<50
5	<50
6	<50

+ Presentan altos títulos anti- *H. capsilatum* por ELISA.

* Última dilución con lectura que excediera la absorbencia media (media + 2 D.S.) de los sueros de los individuos sanos.

TABLA VII
 TITULOS DE ANTICUERPOS POR AGLUTINACION Y ELISA
 EN PACIENTES CON ESPOROTRICOSIS BAJO TRATAMIENTO

FORMA CLINICA	MUESTRA	CARACTERISTICAS	TITULO AGL.+	TITULO ELISA*
Linfangítica	1a	sin tratamiento	512	6,400
	2a	buena respuesta a 2 meses con SSKI**	1024	6,400
Linfangítica	1a	sin tratamiento	512	6,400
	2a	buena respuesta a 4 meses con SSKI	512	6,400
Diseminada	1a	sin tratamiento	256	3,200
	2a	respuesta parcial a 6 meses con SSKI	256	3,200
	3a	curada 1 año con SSKI	256	3,200
Fijo	1a	sin tratamiento	256	3,200
	2a	un mes de tratamiento con itraconazol	256	3,200

+ Recíproco de la dilución más alta del suero que mostrara aglutinación franca.

* Ultima dilución con lectura que excediera la absorbencia media (media + 2 D.S.) de los sueros de individuos sanos.

** SSKI Solución Saturada de Yoduro de Potasio.

inmunotransferencia al probar de 20 a 70 μg de proteína total de la preparación de exoantígeno por carril del gel de poliacrilamida. Los componentes del filtrado del cultivo de *Sporothrix* separados electroforéticamente, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se incubaron con el suero de un paciente con esporotricosis con altos títulos de anticuerpos y se reveló posteriormente con anti-inmunoglobulina humana (Figura 11). El carril cargado con 40 μg de proteína mostró la mejor resolución y definición en el perfil de reactividad con los anticuerpos presentes en el suero. Con esta misma cantidad de exoantígeno de la levadura, se investigó la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero de todos los pacientes con esporotricosis cutánea.

De los nueve polipéptidos resultantes de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Figura 8), 7 reaccionaron colectivamente, con diferente intensidad, con anticuerpos en el suero de los pacientes con esporotricosis (Tabla VIII). De éstos, 4 con pesos moleculares de 27, 30, 34 y 67 kDa, reaccionaron con mayor intensidad (Figura 12). Los 4 sueros de los pacientes con el padecimiento linfocutáneo, reconocieron más fuertemente la banda de 34 kDa, a diferencia de las muestras provenientes de casos diseminados y fijos que mostraron reacción más débil con esta banda. Los polipéptidos con pesos moleculares menores a 27 kDa fueron reconocidos más intensamente sólo por tres sueros de la muestra total (Carriles 1, 5 y 9 Figura 12).

Prácticamente no existió ninguna diferencia en cuanto al patrón de reactividad y su intensidad al analizar muestras del mismo paciente obtenidas a diferentes etapas de tratamiento (Figura 13). Incluso al comparar la muestra proveniente de un paciente con el padecimiento diseminado sin ningún tipo de tratamiento (Tira marcada 0, Grupo 4, Figura 13), con la tercera obtenida 12 meses después cuando el paciente había curado, se observaron prácticamente idénticos, el patrón y la intensidad de la reacción.

Los 6 sueros de los pacientes con histoplasmosis pulmonar reaccionaron con la

TABLA VIII

PORCENTAJES DE REACCION CON LAS BANDAS DEL EXOANTIGENO
DE LA LEVADURA DE *Sporothrix schenckii* POR INMUNOTRANSFERENCIA

BANDA (kDa)	REACCION SUEROS ESPOROTRICOSIS (%)	REACCION SUEROS HISTOPLASMOSIS (%)	REACCION SUEROS SANOS (%)
16	20	16.6	0
18	20	0	0
25	50	16.6	0
27	90	0	0
30	100	100	83.3
31	90	0	0
67	100	16.6	0

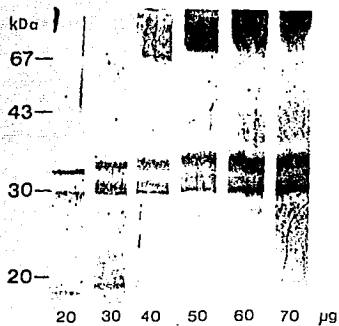


Fig. 11. Inmunotransferencia de distintas cantidades del exoantígeno de la levadura de Sporothrix schenckii. La membrana de nitrocelulosa se incubó con el suero de un paciente con altos títulos de anticuerpos.

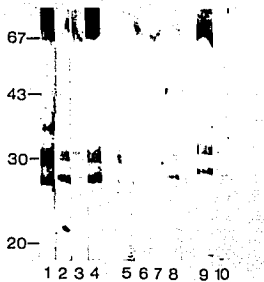


Fig. 12. Reactividad de los anticuerpos de los pacientes con esporotricosis cutánea linfangítica (Tiras 1 a 4), cutánea diseminada (5 a 8) y cutánea fija (9 y 10) con exoantígenos de la levadura de S. schenckii por inmunotransferencia.

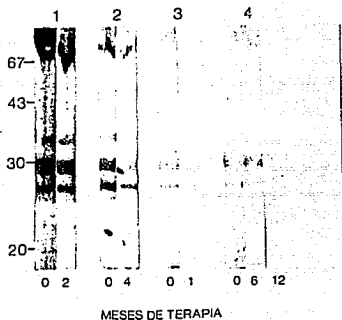


Fig. 13. Comparación por inmunotransferencia de la especificidad de anticuerpos en sueros de pacientes con esporotricosis a antígenos de la levadura, antes y durante terapia. Las tiras marcadas 1 y 2 corresponden a casos linfocutáneos; 3, cutáneo fijo y 4 a una forma diseminada.

banda de 30 kDa, incluso con intensidad similar a la encontrada para algunos de los pacientes con esporotricosis (Figura 14). Una de las muestras de este grupo mostró además reconocimiento de las moléculas de las bandas de 25 y 67 kDa (Tira marcada 1, Figura 14). Salvo en 2 casos, la banda de 30 kDa fue también reconocida, con intensidades muy distintas, por anticuerpos presentes en los sueros de individuos sanos (Tiras 3 a 12, Figura 14).

Con el fin de determinar si los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes son específicos para epítopes de naturaleza glicosídica, se empleó la técnica de oxidación con peryodato de sodio. Los componentes del exoantígeno de *S. schenckii* separados electroforéticamente e inmovilizados sobre membranas de nitrocelulosa se mantuvieron por una hora en soluciones 5 y 10 mM de peryodato, para incubarse posteriormente con los sueros y ser revelados con el conjugado anti-inmunoglobulina humana-peroxidasa. La oxidación del antígeno, disminuyó de manera notable la actividad serológica de las muestras de los pacientes con esporotricosis. Para todas las muestras, sólo las bandas de 30 y 67 kDa presentaron actividad residual para las concentraciones y tiempo de reacción con el peryodato de sodio aquí reportados (Figura 16). La especificidad de los anticuerpos de muestras del mismo paciente obtenidas a distintas etapas de tratamiento, también fueron analizadas con el antígeno oxidado con peryodato de sodio. En estos casos no se observó ninguna variación con respecto al patrón e intensidad de reacción obtenido por la primera muestra. La reactividad con el antígeno oxidado también fue analizada en los sueros de los pacientes con histoplasmosis pulmonar y en los de individuos sanos que mostraron reactividad con componentes del exoantígeno de *Sporothrix*. A diferencia de lo observado con los sueros de los pacientes con esporotricosis, la reacción con la banda de 30 kDa observada para las 6 muestras (100%) y adicionalmente para una muestra

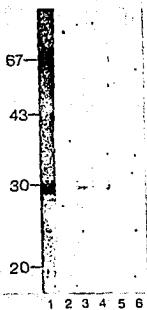


Fig. 14. Reactividad por inmunotransferencia de los anticuerpos en sueros de pacientes con histoplasmosis pulmonar con exoantigenos de la levadura de S. schenckii.

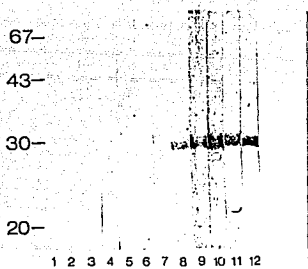


Fig. 15. Reactividad por inmunotransferencia de los anticuerpos en sueros de 12 voluntarios sanos con exoantigenos de la levadura de Sporothrix schenckii.

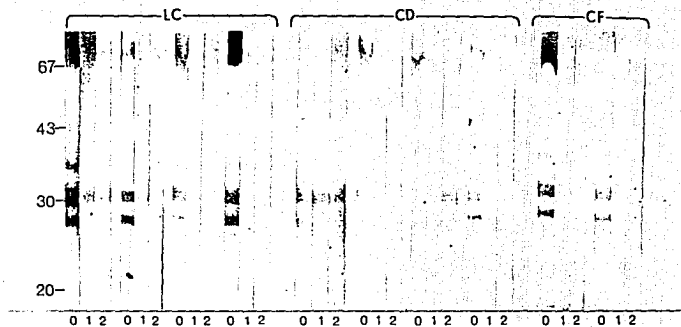


Fig. 16. Efecto de la oxidación de carbohidratos por peryodato de sodio en el reconocimiento de exoantígenos de la levadura de *S. schenckii* por sueros de pacientes con esporotricosis linfocutánea (LC), cutánea diseminada (CD) y cutánea fija (CF) por inmunotransferencia. Las tiras marcadas 0 no se trataron con la solución de peryodato. Las marcadas 1 y 2 se trataron con soluciones 5 y 10 mM de peryodato de sodio respectivamente.

con las bandas de 25 y 67 kDa de los pacientes con histoplasmosis pulmonar, no se afectó de manera significativa (Figura 17). De la misma forma, en ningún caso la oxidación del antígeno con peryodato de sodio afectó de manera notable la reactividad de los anticuerpos presentes en los sueros de voluntarios sanos con la banda de 30 kDa (Figura 18).

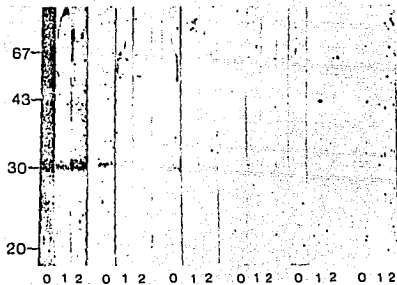


Fig. 17. Efecto de la oxidación de carbohidratos por periyodato en el reconocimiento del exoantígeno de la levadura de S. schenckii por sueros de pacientes con histoplasmosis pulmonar. Las teras marcadas 0 no se trataron con periyodato, las marcadas 1 y 2 se trataron con soluciones 5 y 10 mM de periyodato de sodio respectivamente.

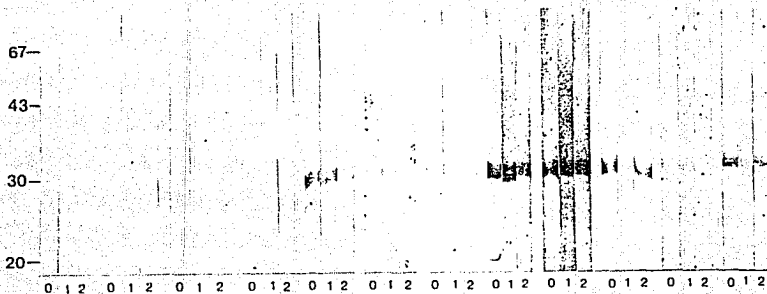


Fig. 18. Efecto de la oxidación de carbohidratos por peryodato de sodio en el reconocimiento del exoantígeno de la levadura de *Sporothrix schenckii* por sueros de voluntarios sanos. Las tiras marcadas 0 no se trataron con peryodato mientras que las marcadas 1 y 2 se trataron con soluciones 5 y 10 mM de peryodato respectivamente.

DISCUSION

La alta exposición humana a *Sporothrix schenckii* en conjunción con la baja incidencia de la esporotricosis en la población general, puede indicar que los mecanismos de defensa, tanto innatos como adquiridos, son relativamente eficientes para proteger contra la infección. Las bases que expliquen porqué esta "micosis de implantación" se desarrolla y cursa hacia alguna forma y severidad particulares en sujetos inmunocompetentes donde provoca formas cutáneas, no son conocidas. La observación de que en zonas de alta endemidad las personas son resistentes a la micosis o desarrollan principalmente un tipo cutáneo fijo, como producto posible de la reinfección (Rippon, 1982; Lavalley y Mariat, 1983), así como el grado de termotolerancia del hongo, que permite la colonización de tejidos más o menos profundos, lo que causa formas diseminadas o fijas respectivamente (Kwon-Chung, 1979), e incluso el estado nutricional de los pacientes (Mariat, 1968; citado por Rippon, 1982), han sido consideradas, entre otras, como posibles fuentes del polimorfismo de la esporotricosis cutánea.

La mayoría de la información que hasta la fecha existe sobre la infección, se refiere a la descripción y tratamiento de los casos, así como de la evaluación de distintos métodos serológicos de diagnóstico. Los reportes sobre el comportamiento inmunológico frente a la infección son escasos y aspectos tales

como la respuesta inmune humoral a los antígenos del hongo no se encuentra bien caracterizada (Scott y Muchmore, 1989).

Dado que la levadura de *S.schenckii* está presente en los tejidos de los pacientes durante la infección activa, se decidió emplear una preparación de exoantígenos a partir de organismos cultivados a 37 C en un medio libre de proteínas, para analizar la especificidad de los anticuerpos presentes en sueros provenientes de casos de esporotricosis cutánea linfagítica, fija y cutánea diseminada, por el empleo de las técnicas de ELISA e inmunotransferencia (Western immunoblot). Así mismo se incluyeron en este análisis, sueros de pacientes con histoplasmosis pulmonar con altos título de anticuerpos anti-*H. capsulatum* y muestras de voluntarios sanos.

Como primera aproximación y con objeto de comprobar la existencia de anticuerpos reactivos con la levadura de *S.schenckii*, se practicó la aglutinación directa que comunmente se ha empleado para el diagnóstico y pronóstico de la infección. Los títulos más altos de la muestra total obtenidos por este ensayo, 512, correspondieron a 3 casos linfagíticos con 1, 2 meses y hasta 25 años de evolución, y a un caso de esporotricosis fija con 20 años de padecimiento (Tablas I y II). El título de 128 para un caso linfagítico correspondió a un caso incipiente, en el cual sólo se produjo un nódulo cutáneo, a parte de la lesión original, a diferencia de los otros casos que mostraron mayor participación de los linfáticos locales y en los que posiblemente exista mayor estimulación antigénica. Todos los pacientes con la forma clínica diseminada se agruparon con un título de 256. Aunque entre los títulos medios de aglutinación de las muestras de los pacientes con esporotricosis (369.7), de pacientes con histoplasmosis pulmonar (117.3) y sueros de individuos sanos (16.6) puede establecerse una diferencia relativa,

algunos títulos de los pacientes con histoplasmosis y de sujetos sanos son iguales a los encontrados en las muestras de los pacientes con esporotricosis (Tablas II, III y IV). De 6 sueros de individuos con histoplasmosis pulmonar, uno mostró un título de 256, igual al encontrado para 5 (50%) de los pacientes con esporotricosis. Cuatro muestras, 2 (33.3%) provenientes de sujetos con histoplasmosis pulmonar y 2 (16.6%) más de la muestra de individuos sanos, compartieron un título de anticuerpos aglutinantes de 128 con el suero del caso linfocutáneo incipiente. Es difícil explicar la baja resolución encontrada entre las muestras de pacientes con esporotricosis y aquellas de los pacientes con histoplasmosis y de individuos sanos. Han sido reportadas pruebas serológicas positivas en que se emplearon antígenos de *Histoplasma capsulatum* y sueros de pacientes con esporotricosis (Post y col., 1958; Maberry y col., 1966, citados por Karlin y Nielsen, 1970) pero se cree que estas reacciones son debidas más a una exposición previa a especies heterólogas, que a una reacción cruzada con *S.schenckii*. Por otra parte, Ashbrook (1954) incluido también en la revisión de Karlin y Nielsen (1970), reporta que un pequeño porcentaje de muestras de individuos sanos, presenta aglutininas para *Sporothrix*, y postula que estas personas presentaron en alguna etapa de su vida esporotricosis subclínica. Estas conclusiones aunadas a la observación de que de los pacientes con esporotricosis, aquellos que presentan formas cutáneas, resultan con los títulos de aglutinación más bajos, posiblemente expliquen la baja resolución y el consecuente solapamiento de algunos de los títulos obtenidos en este ensayo. Los argumentos de Ashbrook, Post y Maberry se apoyan principalmente en la sensibilidad y especificidad de la prueba de aglutinación de levaduras dado que ésta se basa en una molécula antigénica que constituye la capa exterior de la pared celular, la L-rainno-D-manano, un azúcar raro en las

paredes celulares fúngicas (San-Blas, 1982). Incluso al comparar la aglutinación de levaduras o de partículas de látex cubiertas con el antígeno con otros métodos como la fijación del complemento o la inmunodifusión, la aglutinación de levaduras resulta favorecida (Karlin y Nielsen, 1970; Palmer y col., 1977; Kaufman y Reiss, 1992).

A diferencia de lo encontrado en el ensayo de aglutinación de levaduras, la prueba de ELISA mostró una clara resolución entre los pacientes con esporotricosis que resultaron con altos títulos (1,600 a 6,400, Tabla VI) y las muestras de los pacientes con histoplasmosis (Tabla VII) y de voluntarios sanos. En ninguna de las muestras de los dos últimos grupos, se demostraron anticuerpos reactivos con la preparación de exoantígenos de la levadura de *S.schenckii*, con títulos mayores o iguales a 50 (Tablas VI y VII). Los títulos más altos de los pacientes con esporotricosis cutánea correspondieron, al igual que en ensayo de aglutinación directa, a los pacientes con la forma clínica linfangítica (6,400) en la cual los pacientes presentaron varios nódulos cutáneos a parte del chancro esporotricótico original. Como se ha reportado, los pacientes con una notable linfadenitis, con lesiones inflamadas supurantes, son más activos serológicamente que los individuos con una infección superficial y muestran usualmente mayores títulos de anticuerpos (Kite, 1979). Dado que, como ya se indicó, en los pacientes con la forma linfocutánea el sistema linfático interviene, la estimulación antigénica es mayor e incluso anticuerpos reactivos con un mayor número de antígenos del hongo podrían ser producidos. Puesto que en este ensayo se empleó una preparación relativamente cruda de antígenos solubles del hongo, no es posible establecer por los resultados obtenidos por ELISA, si los altos títulos de los pacientes con esporotricosis linfocutánea se deben a la presencia de

anticuerpos reactivos con un mayor número de determinantes antigénicos o de mayor afinidad o más bien a una diferencia sólo de tipo cuantitativo con el resto de los pacientes con esporotricosis cutánea dado que en el ensayo de ELISA se mide la unión de inmunoglobulina total:

Los títulos de anticuerpos demostrados por ELISA no parecen correlacionarse con los tiempos de evolución de la infección, 2 casos con la forma linfagítica, por ejemplo con tiempos de tan diferentes como 1 y 300 meses resultaron con el mismo título de 6,400 (Tablas I y VI).

Los títulos de anticuerpos de las muestras de los pacientes con esporotricosis obtenidas en distintas etapas de tratamiento se mantuvieron sin variación en los ensayos de aglutinación directa y ELISA (Tabla V), incluso para un caso cutáneo diseminado en el que la enfermedad se resolvió por completo un año después de iniciada la terapia con solución saturada de yoduro de potasio (SSKI), por lo que los títulos obtenidos por ambos ensayos no pueden emplearse, al menos en los parámetros aquí descritos, como indicadores pronósticos de la enfermedad. En un seguimiento serológico de 2 casos de esporotricosis sistémica durante 16 semanas y 16 años (Karlín y Nielsen, 1970), el nivel de aglutininas se mostró muy heterogéneo. En el primer caso el nivel inicial de aglutininas después de tener contacto con el hongo fue de 1:20 y alcanzó un título máximo en las sexta y séptima semanas de 1:160, el cual decayó en dos semanas a 1:80 y después de 16 semanas se encontró un título de 1:10. Una última determinación realizada a los 18 meses resultó negativa. Este caso fue tratado con solución saturada de yoduro de potasio (SSKI) y se resolvió la infección totalmente. A diferencia de este comportamiento, el segundo caso, mostró una respuesta serológica bastante más compleja que varió desde un título original de 1,280 a 320 cuatro años después,

menores a 80 a los 8 años después de la infección, se elevó nuevamente a 320 a los 10 años, y se volvió negativa 4 años después y nuevamente aumentó a un título de 160. A diferencia del caso anterior, el paciente se trató con SSKI, anfotericina B y cirugía, dado el carácter recurrente que presentó la infección en este caso. En otro seguimiento se emplearon los ensayos de aglutinación de partículas de látex en laminilla y ELISA para analizar sueros de pacientes con esporotricosis en meninges (Scott y col., 1987) el comportamiento general fue homogéneo, todos presentaron altos títulos en la primera muestra y alcanzaron un nivel máximo en la obtenida durante el mes donde se inició la terapia, posteriormente los títulos de anticuerpos disminuyeron de forma notable. Desafortunadamente no existe ningún otro reporte de un seguimiento serológico y éstos, como se mencionó, corresponden a casos de esporotricosis extracutánea en los cuales el comportamiento y severidad de la infección son distintos a lo observado en pacientes que desarrollan formas cutáneas, por lo cual no es posible establecer, por datos en la literatura, que los títulos de aglutinación y de anticuerpos por ELISA permanezcan o no constantes en distintas etapas del tratamiento, y aún después de eliminada la infección como aquí se reporta. Estos resultados deben comprobarse con un mayor número de pacientes y muestras sucesivas de los mismos.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) de la preparación de exoantígenos de la levadura de *S.schenckii*, se identificaron nueve polipéptidos con pesos moleculares de 14 a 67 kDa (Figura 8), mismos que fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa para ser incubadas con sueros de pacientes con esporotricosis, de sujetos con histoplasmosis pulmonar y muestras de individuos sanos. De forma colectiva, 7 de los nueve componentes de la preparación fueron

reconocidos por anticuerpos en el suero de los pacientes con esporotricosis cutánea (Figura 12 y Tabla VIII). Las bandas con pesos moleculares asignados de 27, 30, 34 y 67 kDa mostraron una mayor reactividad (Figura 12). No se encontró una clara asociación entre el reconocimiento de los componentes individuales de la preparación de antígenos de la levadura de *S.schenckii* y la forma clínica de la esporotricosis cutánea, sólo se estableció una diferencia relativa con respecto a la intensidad de la reactividad encontrada para las muestras de los individuos con el padecimiento linfagítico, la cual se mostró, de forma general, mayor. Con respecto a este mismo grupo de pacientes y a diferencia con lo aquí reportado, Scott y Muchmore (1989), quienes emplearon originalmente la preparación de exoantígenos de la levadura, encontraron reactividad con 8 a 10 bandas comprendidas solamente entre los 40 y 70 kDa, es decir no muestran reacción con 3 de las bandas con mayor reactividad (27, 30 y 34 kDa) descritas en este trabajo.

Los resultados obtenidos por la inmunotransferencia no muestran una correlación entre el patrón de reactividad observado por inmunotransferencia y el tiempo de evolución de la esporotricosis -desde la aparición de las lesiones hasta la toma de la primera muestra durante el cual no existió ningún tipo de tratamiento, por ejemplo para los sueros 4 y 1, ambos procedentes de casos linfagíticos con tiempos de evolución de 2 y 300 meses respectivamente, se encontró prácticamente el mismo perfil de reactividad incluyendo su intensidad (Tabla I y Figura 12). Por otra parte tampoco se detectó reactividad predominante con alguno de los componentes de este antígeno, al comparar los distintos perfiles de reacción por inmunotransferencia, de las muestras de pacientes individuales obtenidas en distintas etapas de tratamiento, o al final del mismo para un caso diseminado clínicamente curado (Figura 13).

Las diferencias de intensidad de la reacción por inmunotransferencia observada entre los pacientes con el mismo título de ELISA (por ejemplo entre las muestras de los casos linfocutáneos, Tabla VI y Figura 12), pueden ser provocadas por las diferencias individuales en la cantidad y tipos de anticuerpos producidos por componentes específicos del antígeno. Las diferencias en la afinidad y avides del antígeno por la nitrocelulosa y los pozos plásticos empleados en el ELISA, explican también las variaciones observadas. Además el tratamiento del antígeno puede causar diferencias en la unión de los anticuerpos, que resulta muy posiblemente en una selección de determinadas poblaciones de los mismos. En ELISA el antígeno soluble total se unió a los pozos en el estado nativo y en la inmunotransferencia, el antígeno se expuso a condiciones reductoras que alteran su estructura y en consecuencia, la avides y afinidad en la reacción antígeno-anticuerpo, posiblemente sean afectadas. Además en el ensayo de ELISA se mide la unión de anticuerpos al antígeno total mientras que, por inmunotransferencia, se detecta la unión de anticuerpos específicos a antígenos separados por peso molecular, incluso se necesitarían experimentos adicionales para determinar si las moléculas de menor peso molecular relativo son modificaciones de la misma proteína o bien son fragmentos resultantes de las condiciones reductoras empleadas en este análisis.

Para determinar si la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con esporotricosis está dirigida a epitopes glicosídicos, los componentes del exoantígeno separados y transferidos electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa, se sometieron a oxidación con peryodato de sodio, una técnica común empleada en el análisis estructural de las glicoproteínas (Clamp y Hough, 1965) y empleada igualmente para ilustrar la participación de

las porciones constituidas por carbohidratos en la reactividad serológica de algunos antígenos procedentes de parásitos como *Schistosoma mansoni* (Hamburger y col., 1982) y *Trypanosoma cruzi* (Xu y Powell, 1991).

La extensa pérdida de actividad serológica después de la oxidación con soluciones 5 y 10 mM de peryodato de sodio sugiere fuertemente que esta actividad está asociada con epítopes carbohidratos (Figura 16). La actividad residual exhibida especialmente por las bandas de 30 y 67 kDa, podría representar un grupo menor de determinantes de naturaleza proteica o lipídica que prácticamente no serían afectados por las concentraciones de 5 y 10 mM durante una hora de incubación (Woodward y col., 1985) o bien ser epítopes carbohidratos no sensibles al peryodato como son los compuestos de cadenas lineales con enlaces C-3 y aquellos que contienen ácido siálico parcialmente acetilado (Woodward y col., 1985).

El hecho de que la reactividad de los anticuerpos de las muestras de los pacientes con esporotricosis esté dirigida en forma significativa contra epítopes glicosilados, posiblemente explique por qué las muestras sucesivas de un mismo paciente, obtenidas en distintas etapas de tratamiento e incluso al término del mismo con la completa resolución de la enfermedad, resulten con iguales títulos de anticuerpos en los ensayos de aglutinación de levaduras y ELISA, e igual patrón e intensidad de reactividad por inmunotransferencia (Tabla V y Figura 13). Muchos polisacáridos microbianos, tales como los procedentes de *Pneumococcus*, no pueden ser degradados por las enzimas del sujeto infectado, de tal forma que persisten por un largo tiempo en la circulación y/o en los tejidos y producen un ciclo, denominado "efecto de molino" (Jahn y Westfal, 1975). Estos polisacáridos se

unen a los anticuerpos inducidos y pueden ser fagocitados como complejos antígeno-anticuerpo. Mientras que el anticuerpo es degradado dentro de los macrófagos, los polisacáridos permanecen intactos y son de forma eventual, nuevamente excretados a la circulación donde son estimuladas algunas clonas específicas de células B, y produciéndose nuevamente anticuerpos reactivos. Es difícil saber si un fenómeno similar está sucediendo en los pacientes con esporotricosis, puesto que la caracterización de las fracciones glicosídicas de este exoantígeno de la levadura de *S.schenckii* no ha sido realizada, sólo de su resultado y evaluación en modelos animales podría definirse el significado de tales moléculas en la esporotricosis y es posible que en este contexto, la persistencia de los antígenos polisacáridos en el sujeto infectado, de existir, juegue un papel importante en el desarrollo de la infección.

No es posible establecer por el solo protocolo de inmunotransferencia aquí empleado si la reacción con el componente de 30 kDa presentada por los 6 (100%) sueros de los pacientes con histoplasmosis pulmonar y por 10 (83.3%) de las muestras de los voluntarios sanos (Tabla VIII) sea causada por la presencia de determinantes homólogos aportados por otra infección o alguna forma de esporotricosis subclínicas o simplemente por un bandedo inespecífico. En el estudio realizado por Scott y Muchunore (1989) en el que se analizaron 30 muestras de individuos normales y 20 más provenientes de pacientes con otras infecciones fúngicas como criptococosis, aspergilosis, candidiasis, coccidioidomicosis e histoplasmosis, sólo el suero de un paciente con histoplasmosis diseminada mostró una reacción débil con un componente de 40 kDa por inmunotransferencia, de la misma manera no se puede establecer si es causada por una infección dual o bien por reacción cruzada. No podemos explicar por que un alto porcentaje de las

muestras de pacientes con histoplasmosis y de individuos sanos, reacciona con los determinantes asociados a la banda de 30 kDa aquí reportada, incluso en algunos casos en proporción semejante a la de los pacientes con esporotricosis (Figuras 14 y 15). La reactividad de los sueros de pacientes con histoplasmosis pulmonar y de individuos sanos con el antígeno tratado con peryodato de sodio, disminuyó en menor proporción con iguales concentraciones y tiempos de incubación que los empleados para las muestras de pacientes con esporotricosis (Figuras 17 y 18) lo que sugiere que la especificidad, si este es el fenómeno que actúa, parece no estar basada en los mismos epítopes glicosídicos o no en la misma proporción que en los sujetos con esporotricosis y que incluso podría estar dirigida a epítopes protéicos o lipídicos.

La variabilidad en la virulencia de distintos aislados de *S.schenckii* ha sido considerada. Los resultados preliminares sugieren que de la "calidad" y sitio del inóculo podrían depender el curso de la infección cutánea (Kwon-Chung, 1979). Un resultado de esta variabilidad podría ser incluso la expresión diferencial de determinantes antigénicos, o sólo en mayor proporción en los organismos "causantes" de alguna forma clínica particular. Este aspecto no puede ser contemplado en este análisis, dado se realizó completamente a partir de un sólo aislado proveniente de un caso linfocutáneo, por lo que las diferencias obtenidas para este grupo de pacientes (mayores títulos de anticuerpos demostrables por aglutinación y ELISA, mayor intensidad de la reacción por inmunotransferencia), podrían ser resultado de anticuerpos inducidos por determinantes antigénicos que sólo se expresan, o sólo en mayor proporción, en los organismos "causantes" de formas linfaglicas y no existentes en las levaduras derivadas de casos fijos o

diseminados. Estudios posteriores podrían centrarse en investigar si las levaduras recuperadas de lesiones linfocutáneas, fijas, diseminadas o incluso de provenientes de casos extracutáneos, muestran de manera significativa una expresión diferencial de determinados epitopes. Un futuro análisis de la especificidad de los anticuerpos en el suero de los pacientes, debe contemplar también el uso de antígenos derivados de ambas fases del hongo e incluso de mayor complejidad que el aquí reportado.

Como se ha mencionado, en la esporotricosis como en cualquiera otra de las enfermedades fúngicas, los factores que afectan la relación con el hospedero, pueden dividirse en dos categorías principales. La primera comprende las características del hongo que le permiten alcanzar los tejidos del hospedero y causar enfermedad, mientras que la segunda, engloba todas aquellas características del hospedero que limitan o permiten la permanencia y multiplicación del agente infeccioso. El destino de la micosis depende pues, de la efectividad relativa de los factores del hongo y del hospedero que entran en juego durante el proceso de enfermedad. La información que hasta la fecha se tiene sobre tales aspectos, no sólo para la esporotricosis, sino para otras infecciones fúngicas es aún fragmentaria (Murphy, 1991). El significado real de la variabilidad en la virulencia entre distintas cepas, como ha sido demostrado por ejemplo para *S. schenckii* (Kwon-Chung, 1979; Dixon y col., 1992) o *Wangiella dermatitidis* (Dixon y col., 1987) en modelos murinos, así como los factores del hospedero que afectan el desarrollo de la enfermedad tales como la predisposición genética, como se ha sugerido para la coccidioidomicosis diseminada, o los factores hormonales que influyen el establecimiento y la progresión, como en las infecciones causadas

por *Candida albicans* y *Coccidioides immitis* (Murphy, 1991) así como los mecanismos de resistencia celular, deberán ser considerados posteriormente.

CONCLUSIONES

Todos los pacientes con esporotricosis mostraron altos títulos de anticuerpos reactivos con la preparación de exoantígenos derivados de la levadura de *Sporothrix schenckii*. Los títulos más altos que se observaron correspondieron a los pacientes que presentaron el tipo clínico linfocutáneo de la infección. Las muestras de pacientes con histoplasmosis pulmonar fueron negativas por ELISA.

Colectivamente 7 de los 9 componentes presentes en la preparación de exoantígenos fueron reconocidos por anticuerpos en los sueros de los pacientes. Las bandas que presentaron mayor reactividad fueron las de 27, 30, 34 y 67 kDa. También se observó reactividad con la banda de 30 kDa con los sueros de pacientes con histoplasmosis y con las muestras de voluntarios sanos.

Los perfiles de reactividad con los antígenos por inmunotransferencia en pacientes individuales, no mostraron cambios significativos durante la terapia.

La oxidación del antígeno con peryodato de sodio elimina gran parte de la actividad serológica de los sueros de los pacientes con esporotricosis lo que indica la importancia de los carbohidratos en la respuesta humoral.

No se encontró una clara asociación entre la reactividad de los antígenos y la forma clínica de la esporotricosis cutánea.

BIBLIOGRAFIA

Albornoz, M., Villanueva, E. y Torres, E. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. *Mycopathologia*, 1984 85: 117.

Alexopoulos, C.J. *Introductory Mycology*. 1962. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Arenas, R., Domínguez-Cherit, J., Fernández, G. y Domínguez-Soto, L. Esporotricosis diseminada. Presentación de tres casos. *Med. Cutan. Iber. Lat. Amer.* (En prensa).

Balows, A. y Hausler, J. *Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections*. 1981. American Public Health Association, U.S.A.

Berson, S. y Brandt, F. Primary pulmonary sporotrichosis with unusual fungal morphology. *Thorax*, 1977 32:505.

Bonifáz, A. *Micología Médica Básica*. 1990. Ed. Méndez Cervantes, México.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976 72: 248.

Bullock, W y Fasal, P. Studies of immune mechanism in leprosy. III The role of cellular and humoral factors in impairment of the in vitro immune response. *J. Immunol*, 1971 106 (4):888.

Chatelain, R., Varkila, K., y Coffman, L. IL-1 induces a T_H2 response in *Leishmania major* infected mice. *J. Immunol*, 1992 148 (4):1182.

Conant, N., Tillerson, S., Denio, B. y Lamar, C. 1972. *Micología Interamericana*, México.

Clamp, J. y Hough, L. The periodate oxidation of amino acids with reference to studies on glycoproteins. *Biochem. J.* 1965 94 (17):17.

Dixon, D., Polak, A. y Szaniszlo, P. Pathogenicity and virulence of wild-type and melenin-deficient *Wangiella dermatitidis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 1987 25: 97.

Dixon, D., Salkin, I., Duncan, R., Hurd, N., Haines, J., Kemna, M. y Coles, F. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1991 29 (6): 1106.

Evans, E. y Richardson, M. *Medical Mycology. A Practical Approach*. 1989. IRL Press, Oxford University Press.

Fitzpatrick, J. y Eulbanks, S. Acquired immunodeficiency syndrome presenting as disseminated cutaneous sporotrichosis. *Cameo*, 1988 27 (6): 406.

González-Ochoa, A. Sporotrichosis. En: Simons, R. *Medical Mycology*. 1951. Elsevier Publishing Co. Amsterdam.

Hamburger, J., Lustigman, S., Arap, T., Ouma, y Mahmoud, A. Characterization of a purified glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs: specificity, stability and the involvement of carbohydrate and peptide moieties in its serologic activity. *J. Immunol.* 1982 128 (4):1864.

Harada, T., Nishikawa, T. y Iatano, H. Antigenic similarity between *Ceratomyces* species and *Sporothrix schenckii* as observed by immunofluorescence. *Sabouraudia*, 1976 14: 211.

Jann, K y Westfal, O. *Microbial Polysaccharides*. En: Sela, M. *The Antigens*. Vol. III. 1975. Academic Press, New York.

Karlin, J. y Nielsen, H. Serologic aspects of sporotrichosis. *J. Infect. Dis.*, 1970 121 (3): 316.

Kaufman, L. y Reiss, E. *Serodiagnosis of Fungal Diseases*. En: Rose, N., Conway, E., Fahey, J., Friedman, H. y Penn, G. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 1992. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Kite, J. Immunology of Mycotic Diseases. En: Rose, N., Milgrom, F. y Van Oss, C. Principles of Immunology. 1979. McMillan Publishing Co. New York.

Kwon-Chung, K. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types lesions. J. Infect. Dis., 1979 139 (4):124.

Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 1970 227: 680.

Lavalle, P. y Mariat, F. Sporotrichosis. Bull. Inst. Pasteur, 1983 81: 295.

Lurie, H. Five unusual cases of sporotrichosis from South Africa showing lesions in muscles, bones and viscera. Brit. J. Surg., 1963 50: 585.

Lloyd, K. y Bitoon, M. Isolation and purification of a peptidoglycan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. J. Immunol., 1971 107: 663.

Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Picinini, M., Santoni F., De Carli, M., Ricci, M. y Romagnani, S. Reciprocal regulatory effects of Gamma-IFN and IL-4 on the in vitro development of human T_{H1} and T_{H2} clones. J. Immunol., 1992 148:2142.

McKinnon, J., Conti-Diaz, I., Gezuele, E., Civila, E. & Da Luz, S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. Sabouradia, 1969 7: 38.

Meléndez, C., González A., Sotomayor, J., Ruiz V. y Ramos, R. Perfil inmunológico del paciente con esporotricosis linfocutánea. Mycopathologia, 1983 83: 169.

Mendoça-Hagler, L., Travassos, L., Lloyd, K. y Phaff, H. Deoxyribonucleic acid base composition and hybridization studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii* and *Ceratomyces* species. Infect. Immun. 1974 9: 934.

Mossman, T. y Moore, K. The role of IL-10 in crossregulation of T_{H1} and T_{H2} responses. Immunoparasitology Today, 1991. Combined issue of Immunol. Today 12 (3):49 and Parasitol. Today 7 (3):49.

Murphy, J. Mechanisms of natural resistance to human pathogenic fungi. Ann. Rev. Microbiol., 1991 45:509.

Palmer, D., Kaufman, L., Kaplan, W. & Cavallard, J. Serodiagnosis of Mycotic Diseases. 1977. Thomas, Springfield, Illinois.

Plouffe, J. y Silva, J. Cell-mediated immune responses in sporotrichosis. J. Infec. Dis., 1979 139 (2): 152.

Polonelli, L. y Morace, G. Exoantigen studies of *Sporothrix schenckii*, *Ceratomyces minor* and *Graphium penicillioides* cultures. J. Clin. Microbiol., 1982 15 (3): 362.

Quentin, M. y Weiser, R. Bacteriología y Micología Médicas. 1988. Interamericana, México.

Rafal, E. y Rasmussen, J. An unusual presentation of fixed cutaneous sporotrichosis: a case report and review of the literature. J. Amer. Acad. Dermatol., 1991 25 (2): 928.

Rippon, J. Medical Mycology. 1982. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Romagnani, S. Human T_H1 and T_H2 subsets: doubt no more. Immunol. Today, 1991 12 (8):256.

Rose, N., Friedman, H. y Fahey, J. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 1986. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Ruiz, R., Segalora, L. y Poli, G. Nuevo Diccionario Médico. 1984. Teide. Barcelona.

San-Blas, E. The cell wall of fungal human patogen: its possible role in host-parasite relationships. Mycopathologia, 1982 79: 159.

Scott, E., Kaufman, L., Brown, A. y Muchmore, H. Serologic studies in the diagnosis and management of meningitis due to *Sporothrix schenckii*. N. Engl. J. Med., 1987 317 (15): 935.

Scott, E. y Muchmore, H. Immunoblot analysis of antibodies responses to *Sporothrix schenckii*. J. Clin. Microbiol., 1989 27 (2): 300.

Towbin, H., Stacherin, T. y Goron, J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979 76: 4350.

Travassos, L., Gorin, P. y Lloyd, K. Comparison of the rhamnomannan from the human pathogen *Sporothrix schenckii* with those from *Ceratocystis* species. *Infect. Immun.* 1973 8: 685.

Voller, A. y Bidwell, D. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. En: Rose, N., Friedman, H. & Fahey, J. 1986. Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology. Washington D.C.

Wilson, D., Mann J., Bennet, J. y Utz, J. Clinical features of extracutaneous sporotrichosis. *Medicine*, 1967 46 (3): 265.

Woodward, M., Young, W. y Bloodgood, R. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immuno. Method.*, 1985 78: 143.

Xu, B. y Powell, M. Carbohydrate epitopes are responsible for antibody cross-reactivity in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Parasitol.* 77: 808.