

11261
4
E, 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

ESTUDIO DE ALGUNOS ASPECTOS
EPIDEMIOLOGICOS Y PATOGENICOS
DE Sporothrix schenckii.

Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas

que presenta la Q.F.B.

ALEJANDRA PAULA ESPINOSA TEXIS

ASESOR: DR. RUBEN LOPEZ MARTINEZ

- 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

La esporotricosis es una micosis subcutánea, granulomatosa de evolución subaguda o crónica, caracterizada por lesiones nodulares que generalmente siguen el trayecto de los vasos linfáticos, posteriormente se ablandan y se abren (gomas) para formar úlceras indoloras; en ocasiones hay diseminaciones a pulmones, huesos, articulaciones, sistema nervioso central y tracto genitourinario. El agente etiológico es el hongo dimórfico Sporothrix schenckii (5,56).

Se atribuye a Montagne la descripción de la primera especie patógena en 1844, sin embargo el primer reporte lo realiza Schenck en 1898 en Baltimore. En 1900 Hektoen y Perkins (25) presentan un caso cuyos hallazgos patológicos, clínicos y micológicos eran idénticos a los descritos por Schenck y denominan al agente etiológico Sporothrix schenckii. En México Gayón describe el primer caso en 1914; después del cual se ha presentado esta micosis en forma permanente y en un número considerable (33,34).

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico el cual presenta la forma de levadura tanto en muestras biológicas como en medios enriquecidos a 37°C y forma micelial cuando se encuentra en la naturaleza o se le cultiva a temperatura ambiente o a 28°C .

La principal vía de entrada del hongo al tejido humano ocurre mediante traumatismos o laceraciones en piel, a través de material que contiene la forma micelial infectante, pasando a la fase levaduriforme en el hospedero; sin embargo se han descrito casos pulmonares de esta micosis cuya vía de entrada es la respiratoria. El período de incubación de la esporotricosis cutánea es de 8-10 días.

En la naturaleza el hongo se encuentra principalmente en vegetales como: zacate, paja, forraje, plantas espinosas, madera, musgo; suelo, etc. En México la mayor frecuencia de infección coincide con las estaciones frías y secas del año. S. schenckii parece ser resistente a la desecación pero sensible a la exposición directa de la luz solar y del frío severo (<5°C).

La esporotricosis presenta una amplia distribución mundial; no posee limitaciones geográficas, se ha encontrado en zonas secas y casi áridas, tropicales, semitropicales, templadas y húmedas; es rara en Europa, frecuente en Asia, África, Oceanía y América, principalmente en el centro y sur de este último continente. En México ocupa el primer lugar dentro de las micosis subcutáneas.

Esta micosis se presenta con mayor frecuencia en campesinos, granjeros, floristas, horticultores, carpinteros, empacadores de loza, etc.. El mayor porcentaje corresponde al sexo masculino y todas las razas parecen ser igualmente susceptibles. En México el mayor número de casos se presenta en adultos jóvenes y en niños.

Existen en la literatura varias clasificaciones clínicas de la esporotricosis, desde la primera propuesta por los franceses De Beurmann y Gougerot; posteriormente las mexicanas de Lavalle (32) y González Ochoa (17); Rippon (56). González Ochoa en 1952-1953 propone la siguiente, que es una de las más aceptadas.

		Gomosa ascendente de las extremidades
	Tipo Linfangítico	Gomosa de otras regiones
Cutánea	Tipo Fijo	Ulcerativo
		Verrucoso
		Acnelforme
		Placa infiltrada
		Eritemato-escamoso
	Tipo Hematógeno	Gomosa diseminada sobre cualquier parte de la superficie cutánea
Extracutánea		Primaria
		Concomitante con la forma gomosa de otras regiones
		Secundaria a los tipos linfangítico y fijo

El diagnóstico de laboratorio de esta micosis se realiza básicamente mediante el cultivo de muestras biológicas y la intradermoreacción con esporotricina metabólica (20, 22, 56).

En la esporotricosis el examen microscópico directo es de poco valor para fines diagnósticos, ya que el hongo rara vez se observa en lesiones humanas (38,51). En tejidos de animales con infección natural o experimental se observan fácilmente las formas parasitarias, en las que *S. schenckii* aparece bajo la forma de: levaduras en forma de cigarro, cuerpos ovoides, cuerpos asteroides, formas en anillo y ocasionalmente hifas.

Por medio de sistemas inmunoenzimáticos o de anticuerpos fluorescentes se pone de manifiesto la presencia del hongo en las muestras biológicas de casos humanos (20,29,70).

Aún cuando el diagnóstico de la mayoría de las micosis incluye el examen directo del producto patológico, en la esporotricosis parece ser la excepción (21,28,56), por la dificultad de encontrar la forma parasitaria del hongo, sin embargo existen reportes que señalan la presencia de levaduras, cuerpos asteroides y aún micelio, que se llegan a observar ocasionalmente (25,30,40,46,47,55,58).

A pesar de no encontrar a las estructuras parasitarias en las muestras biológicas, cuando se siembran estos productos, se obtiene en casi todos los casos el desarrollo de *S. schenckii* (22,32,56). Este contraste conduce a pensar en varias causas entre las que pueden incluirse: 1) que el parásito adquiere diferentes aspectos confundibles con elementos tisulares ordinarios, 2) muy pocas células fúngicas presentes 3) labilidad del hongo dentro del organismo humano, 4) presencia de partículas fúngicas menores de 0.2 μm de tamaño, no observadas por el microscopio óptico de uso rutinario en los laboratorios de diagnóstico, 5) búsquedas no eficaces de las formas parasitarias del hongo en muestras obtenidas de pacientes y 6) hábitat intracelular del hongo (4,15,16,21,56,65).

Las pocas estructuras de *S. schenckii* que llegan a observarse presentan formas en huso, bacilares cortas, basófilas que miden de 1 - 3 μm por 2 - 5 μm , presentándose solas o en grupo, células ovoides o esféricas, levaduras simples o en gemación de 3 - 5 μm de diámetro.

Los cuerpos asteroides, típicamente consisten en una levadura oval o redonda con reacción basófila de 3 - 5 μm de diámetro, con prolongaciones de tipo radial de reacción eosinofílica de hasta 10 μm . (4,47,56,58).

Contrariamente a lo que ocurre en humanos la observación de las formas parasitarias en animales con infección natural o experimental es muy frecuente. Los animales mas susceptibles a la infección experimental son los ratones, ratas, cobayos y hamsters (2,3,12,15,36,56) siendo las vías Intrapertoneal y la Intratesticular las mas utilizadas (2,3,7,12).

ANTECEDENTES

1.- Epidemiología.

1.1.- Ecología.

El hábitat de S.schenckii es el suelo, madera, zacate, paja, musgo, plantas espinosas, clavales, algas y vegetales en descomposición (6,13,35,45,56).

Findley (15) considera una temperatura óptima para el desarrollo del hongo de 27 - 29°C y humedad relativa del 92 - 100%; en cambio MackInnon (42) señala una humedad del 90% y una temperatura de 15°C - 20°C.

1.2.- Distribución.

Algunos autores consideran que S.schenckii no posee limitaciones geográficas, se ha encontrado en zonas secas y casi áridas como en regiones tropicales, subtropicales, templadas y húmedas. La esporotricosis es de amplia distribución mundial, existen reportes de los cinco continentes, sin embargo su incidencia varía considerablemente. Es rara en Europa, frecuente en Asia, África, Oceanía y América; siendo México, centro y sudamérica los lugares de mayor frecuencia.

La esporotricosis en la República Mexicana ocupa el primer lugar dentro de las micosis subcutáneas, presentándose en forma esporádica en todo el país o en zonas de endemia, siendo los estados de Distrito Federal, Guanajuato, Puebla, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Nuevo León, Guerrero, Hidalgo, Veracruz y el Distrito Federal los sitios donde se presenta con mayor frecuencia.

Existen reportes en la literatura mexicana que señalan pequeñas epidemias en algunos estados del país como: González-Benavides que menciona epidemias entre alfareros en Monterrey N.L.; Medina-Ramírez en San Luis Potosí; Garret y Robbins en Ciudad Juárez Chihuahua; González Ochoa en Jalisco y la Sierra de Puebla; Lavalle menciona 4 epidemias familiares de Tlalpizahua, México.D.F., San Luis Potosí y Puebla en donde llega a aislar al hongo a partir de una planta de bugambilia (32,35,66,67).

A nivel mundial sobresalen los estudios realizados por Padilha Goncalves, quien menciona que la distribución geográfica de la esporotricosis no indica una geopatología característica de la micosis(54). Conti-Díaz en Uruguay menciona que la incidencia de la enfermedad ha aumentado en ese país y señala que el origen de la enfermedad fue el

contacto con armadillos o sus cuevas (6), Mayorga y cols. (45) en Guatemala describen una zona endémica en la región de la Laguna de Ayarza, relacionando la infección con el manejo de pescado; Pijper y Pullinger mencionaron lo que se considera la mayor epidemia de esporotricosis en la historia, con casi 3000 casos en las minas auríferas de Transval, Africa del Sur, siendo la principal fuente de infección las vigas de soporte de las minas (54,56).

1.3.- Aislamiento.

En la mayoría de los brotes epidémicos se ha logrado aislar al hongo de la naturaleza (42). De Beurmann y Gougerot en 1908 fueron los primeros en observar el desarrollo de S. schenckii en la naturaleza a partir de la corteza del árbol de la haya, de las hojas de la planta cola de caballo que se desarrollaba en la base del árbol y posteriormente de granos secos de arena. Stortory hizo observaciones similares sobre cepas aisladas de la cáscara del trigo (13) Emmons recuperó al hongo de una muestra del musgo esfagneo, señalado como fuente de infección entre floristas. Brown, Weintraub y Simpson en 1947 aislaron S. schenckii a partir de la madera empleada como soporte en las minas de oro de Witwatersrand, ellos observaron al hongo in situ y obtuvieron cultivos de diferentes muestras de madera (13).

En 1941 Gastinau, Spolyar y Haynes relatan la presencia de S. schenckii en el musgo manipulado por floristas que padecieron posteriormente la enfermedad, de igual manera Crevasse y Ellner en 1960 mencionan al musgo como fuente de infección. En 1962 Dean y Haley lo aislaron de 10 capas del suelo; Orr y Howard aislaron 9 cepas silvestres del suelo, estiércol de rata y 1 de madera.

Mackinnon y col. en 1969 (42) en Uruguay aislaron 7 cepas de S. schenckii a partir de 125 muestras de desechos de plantas y suelo, relacionando al mismo tiempo la adquisición de la infección en humanos con traumatismos realizados con material empleado por los armadillos para hacer sus nidos.

En 1976 Feuerman y col. (14) aislan al hongo a partir de muestras de suelo en Israel, considerada fuente de infección de la enfermedad.

Mayorga y cols. (46) realizaron estudios en una zona endémica de esporotricosis en la región de la laguna de Ayarza en Guatemala, sin conseguir aislar el hongo del material que se muestreó.

En México Lavalle (35,36) logra el aislamiento del hongo a partir de una bugambilia en San Pedro Pellacolla del estado de Puebla.

El aislamiento de S. schenckii de la naturaleza parece ser mas frecuente en zonas endémicas, aunque también se ha aislado en áreas donde la enfermedad no se ha registrado (23,41,63,64).

2.- Histopatología.

La característica histopatológica de la esporotricosis es una combinación de reacciones plúgena y granulomatosa, que contiene histiocitos, plasmocitos, focos de polimorfonucleares, células gigantes de tipo Langerhans y de cuerpo extraño, acompañada de alteraciones epidérmicas que consisten en hiperplasia pseudoepitelomatosa con formación de microabscesos intraepidérmicos de polimorfonucleares (pmn)(36,56).

En 1900 Hektoen y Perkins (25) observaron la presencia de abundantes leucocitos pmn en focos densos, sin determinar la presencia de algún microorganismo en tinciones histopatológicas realizadas a muestras de abscesos cutaneos.

Corresponde a Splendore en 1908, la primera observación de radiaciones rodeando células de "Sporotrichum" en tejidos humanos, denominando a dichas estructuras "Formaciones Asteroides" o "Cuerpos Asteroides" que fueron encontradas extracelularmente en pus de lesiones elásticas, verrucosas, vegetantes y duras. En ese año Greco en Argentina describió estas formas radiadas en lesiones de hombres y de ratas, posteriormente aparecen mas reportes de formaciones asteroides realizados por Talice, Mackinnon, Moore y Ackerman y Pinkus (48,55).

Moore (47,48) en 1946 describe formaciones radiadas de hongos patógenos en tejidos humanos incluyendo en este grupo a Sporothrix schenckii. Moore indica que la presencia del hongo en tejido puede presentarse en dos tipos: a) En tejido o pus las células del hongo pueden observarse como bacilos cortos o formas de huso, basófilos, de 1 - 3 μ m por 2 - 5 μ m, solos o en grupos, pueden encontrarse con dificultad células ovoides o esféricas libremente dispersas en el material necrótico o fagocitado por leucocitos mononucleares o macrófagos. b) Un segundo tipo denominado "Forma

Asteroide" caracterizado en tejido o pus por la presencia de una estructura radiada sobre el hongo, siendo la célula central esférica y de pared gruesa de 5 μm de diámetro, los rayos varían en grosor de 2 - 8 μm , los cuerpos acidófilos pueden verse a través del nódulo, los cuales están hechos de rayos cortos. Las estructuras de radiación se observan dentro de microabscesos rodeados por leucocitos polimorfonucleares y otras células de tipo inflamatorio. En algún tiempo los cuerpos acidófilos fueron identificados como la forma asteroide de S. schenckii.

En 1950 González-Ochoa y Soto Pacheco (21) describen el ciclo evolutivo de S. schenckii in vitro: en el estado parasitario el hongo se encuentra bajo el aspecto de elementos cocoides, basófilos, de diversos tamaños y formas: ovoides, redondos o piriformes, en masa, que se encontrarían predominantemente dentro de las células tomando el aspecto de esferas pequeñas huecas, medias lunas o signos en coma, rodeados de una sustancia acidófila dándole la apariencia de halo, de estos elementos se derivan las formas en cigarro, que se engruesan posteriormente, y se tornan ovoides, piriformes, emitiendo un tubo germinativo que madura, se tabica y ramifica, constituyendo así el micelio y finalmente forma los conidios.

Lurie y Still en 1969 (40) realizan estudios sobre la naturaleza del cuerpo asteroide, concluyendo que este se forma como resultado de la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo sobre la superficie, que al aumentar daría como resultado una forma asteroide, depositado sobre la superficie del hongo.

En 1963 Lurie y Still (40) clasifican a los granulomas como: 1.- Esporotricósico. 2.- Tuberculoide. 3.- de Cuerpo extraño.

La lesión básica del granuloma esporotricósico es una reacción consistente en masas de histiocitos epiteloideas, los cuales tienen tendencia a formar zonas concéntricas. El área central de la lesión consiste de neutrófilos o material necrótico rodeado por un infiltrado de neutrófilos, algunas células plasmáticas y linfocitos. El granuloma tuberculoide es una reacción cuya área es una combinación de células epiteloideas mezcladas con fibroblastos, linfocitos y células gigantes de Langerhans. Otras lesiones, pueden presentar una capa externa de células plasmáticas, lo que puede sugerir una reacción tipo sifiloide, que está formada por plasmocitos, linfocitos y fibroblastos, con neoformación vascular y engrosamiento de sus paredes. Esta disposición en zonas no es constante, ya que los elementos celulares suelen

entremezclarse. (36,56). En las lesiones de esporotricosis crónica, la hiperplasia pseudoepiteliomatosa puede ser tan extensa que sugiere una neoplasia.

En 1963 Lavalle y cols. (39) señalan la presencia de cuerpos asteroides en muestras de pacientes con esporotricosis, posteriormente presenta reportes de otros casos en donde observa la forma parasitaria del hongo.

Existen pocos reportes en la literatura que indiquen la observación de hifas en muestras patológicas, en 1911 Adamson observa la presencia de hifas y posteriormente, también Mount, Wade y Mathews, Okudaira, Lurie y Maberry (29,37).

En 1982 Kinbara y Fukushima (31) mencionan que en el 64.5% de los pacientes con esporotricosis encuentran cuerpos asteroides, elementos fúngicos libres y levaduras simples o en gemación; hifas en el 93.5% de los pacientes y elementos fúngicos intracelulares en el 61.2% consistentes en esporas dentro de células gigantes.

En 1986 Hiruma y Kagawa (26) comunican un caso de esporotricosis con numerosos elementos fúngicos fagocitados por pmn, presencia de cuerpos asteroides, micelio, células ovales o gemantes en macrófagos y células gigantes junto con elementos fúngicos extracelulares, ocasionales blastosporas, hifas y tubos germinales, una marcada inflamación con masas de polimorfonucleares asociada con cuerpos asteroides dentro de los microabscesos, por lo que se sugiere que la formación de los cuerpos asteroides está íntimamente relacionada con la fagocitosis de los polimorfonucleares.

En 1985 Rodríguez Toro (58), y Rodríguez Toro y Palencia (59) enfatizan el posible valor diagnóstico del cuerpo asteroide en la esporotricosis. Observaron un caso de cuerpo asteroide fagocitado por una célula gigante y en una ocasión observaron que la levadura estaba en gemación. Excepcionalmente se observaron fuera de los microabscesos mayores, rodeado solamente de escasos polimorfonucleares.

Uribe, Zuluaga y Restrepo (70) en Colombia comentan la utilidad de métodos inmunoenzimáticos para la búsqueda de las formas parasitarias de *S. schenckii*. La técnica de inmunoperoxidasa mostró blastoconidias del hongo en todos los casos estudiados aunque en escaso número, predominando estas estructuras en la dermis profunda, media, en la unión dermoepidérmica, estrato espinoso y en la capa córnea.

3.- INMUNOFLUORESCENCIA.

Esta técnica fue usada por primera vez por Coons y cols. en 1942. La técnica de anticuerpos fluorescentes facilita la visualización de los elementos fúngicos(20,29,30).

La inmunofluorescencia indirecta ofrece la posibilidad de descubrir elementos viables, como en los estudios realizados por Kaplan y González Ochoa (29) quienes obtuvieron cultivo negativo e inmunofluorescencia positiva en muestras de un paciente.

En 1963 Kaplan y González Ochoa (29) publicaron una nota sobre la aplicación de la técnica de anticuerpos fluorescentes para el diagnóstico rápido de esporotricosis, en comparación con el cultivo, mostrando resultados satisfactorios. Las estructuras observadas variaban en su morfología siendo posible encontrar formas en cigarro, levaduras simples o gemantes, estructuras elípticas, baciliformes, "nidos" de microcolonias.

Kaplan e Ivens (30) visualizaron elementos del hongo a partir de exudados de lesiones de esporotricosis en experimentos con animales y algunos casos clínicos mediante inmunofluorescencia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A) En México la esporotricosis ocupa el primer lugar dentro de las micosis subcutáneas; el estado de Puebla es uno de los lugares donde se presenta con mayor frecuencia, debido a que reúne las condiciones óptimas a nivel ecológico y socioeconómico, por el tipo y condiciones de trabajo desarrollado en las regiones rurales del estado. A pesar de esto no se conoce con exactitud la casuística ni el índice de infección; tampoco se ha determinado en esta región el tipo de vegetación que está relacionada con el hábitat de Sporothrix schenckii, por lo que es necesario realizar un estudio sobre esta micosis que pueda aportar nuevos datos sobre la epidemiología de esta micosis.

B) En la esporotricosis, son pocos los casos positivos a la observación de las formas parasitarias del hongo en las muestras biológicas mediante las tinciones habituales, cual es una limitante para el diagnóstico. Por lo anterior sería conveniente investigar la presencia de las formas parasitarias presentes en muestras de pacientes, mediante técnicas como la inmunofluorescencia.

C) Aún cuando se sabe que el período que transcurre entre la entrada del hongo en su fase filamentosa y el establecimiento y transformación a la forma parasitaria es relativamente corto, se desconoce el tiempo exacto de la conversión, así como la abundancia de las formas parasitarias de los órganos susceptibles a la diseminación de S. schenckii por lo que es necesario diseñar modelos experimentales en animales para determinar este dato.

HIPOTESIS

1.- Al ser las condiciones ecológicas y socioeconómicas que prevalecen en las regiones rurales del estado de Puebla similares a las de otras regiones con un alto índice de esporotricosis, se espera determinar, en las regiones encuestadas índices elevados de infección, así como aislamiento frecuente del hongo a partir de fuentes naturales.

2.- Las estructuras fúngicas menores de $0.2\mu\text{m}$, pueden ser visibles en los tejidos de animales inoculados con S. schenckii y en los pacientes con esporotricosis mediante técnicas de inmunofluorescencia.

3.- Se observan diferentes morfologías parasitarias de S. schenckii, tanto en la inmunofluorescencia como en las técnicas de tinción histopatológica.

OBJETIVOS.

- 1.- Determinar la prevalencia de la esporotricosis en una población rural del estado de Puebla, a través de un estudio epidemiológico con cutirreacción con esporotricina.
- 2.- Conocer la frecuencia de aislamiento de S. schenckii a partir de suelos y de vegetales en las áreas rurales encuestadas.
- 3.- Determinar cuales son los órganos susceptibles a la diseminación de S. schenckii a través de la inoculación intraperitoneal en cobayos.
- 4.- Determinar la frecuencia de las diversas formas parasitarias: cuerpos en cigarro, cuerpos ovoides y cuerpos asteroides de S. schenckii en la infección experimental.
- 5.- Demostrar mediante técnicas de inmunofluorescencia, partículas fúngicas menores de 0.2µm en tejidos de pacientes y de animales infectados.
- 6.- Determinar el tiempo de conversión de la fase micelial a la parasitaria de S. schenckii en cobayos.

MATERIAL Y METODOS.

I. - ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS.

1.1.- Zona geográfica estudiada.

El estado de Puebla está dividido en 21 distritos subdivididos en varios municipios libres, presentando una gran variedad de tipos climatológicos y contrastes topográficos muy marcados, motivo por el cual, el estado se divide en 3 regiones naturales que comprenden:

- A) Región norte o de la Sierra, húmeda y fría, típicamente montañosa.
- B) Planicies meridionales, con clima seco y templado.
- C) Región sur, con clima semidesértico.

Se seleccionaron dos municipios ubicados en la zona norte: Jicolapa y Progreso (fig. 1) poblaciones que no han sido estudiadas en relación a la esporotricosis.

1.2.- Obtención de esporotricina celular.

La fase micelial de la cepa CIM-ICUAP 6030 de S. schenckii del laboratorio de micología del Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla mantenida en agar micobiótico, se sembró en un medio líquido químicamente definido. Se incubó a 37°C en agitación constante, realizando preparaciones en fresco periódicamente, haciendo pases sucesivos hasta la obtención total de levaduras. Posteriormente se tomaron alícuotas de concentración constante para realizar pruebas de tolerancia a la temperatura, para lo cual se colocaron tubos con levaduras de S. schenckii en medio líquido, en baño María a 60°C. Se tomaron alícuotas cada 5 minutos durante 120 minutos que fueron sembradas por triplicado en agar glucosa Sabouraud, incubando a 28°C/20 días para determinar viabilidad.

Para la obtención del antígeno levaduriforme de S. schenckii, se colocaron matraces conteniendo levaduras en el medio líquido químicamente definido, para inactivar las

levaduras se incubaron 2 horas en baño María a 60°C, al término de este período las levaduras se centrifugaron a 300g/20 minutos, 4 veces, lavando con solución salina isotónica (SSI) después de cada centrifugación. Posteriormente se cuantificó el número de levaduras por mililitro en un hemocitómetro, la concentración de levaduras se igualó al número de células presentes en la esporotricina levaduriforme del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia SA(INDRE). Se utilizaron frascos de 2 ml para envasar el antígeno obtenido, bajo campana de flujo laminar.

La prueba de esterilidad del antígeno se realizó a partir de seis frascos tomados al azar de un lote de 30, sembrando 0.1ml en tubos con BHI, floglicolato y Sabouraud por triplicado, incubando a 37°C/60 días y 28°C/60 días.

La esporotricina metabólica se obtuvo del INDRE.

1.3.- Encuesta Epidemiológica.

1.3.1.- Aplicación de la esporotricina.

Se realizó en las dos comunidades rurales del estado de Puebla: Jicolapa perteneciente al municipio de Zacatlán y Progreso del municipio de Teztlutlán.(Figura 1). En la comunidad de Jicolapa se aplicaron 133 Intradermorreacciones y en Progreso 237 a la población en general, incluyendo a ambos sexos de todos los grupos de edad.

Se aplicaron 0.1 ml de esporotricina levaduriforme obtenido en el laboratorio de Micología Básica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por vía intraepidérmica en el antebrazo derecho y 0.1 ml de esporotricina levaduriforme (INDRE) en el antebrazo izquierdo, las lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas, considerando una prueba positiva cuando el diámetro de induración fue mayor o igual a 5 mm y prueba negativa si el diámetro de induración era menor a 5 mm.

A todas las personas positivas a alguna de las dos esporotricinas celulares (UNAM o INDRE) se les aplicó 0.1 ml de esporotricina polisacárida (INDRE) en el antebrazo izquierdo, considerando los mismos criterios de lectura. A las personas con Intradermoreacción (IDR) positiva a esta última se les realizó estudios clínico, de cultivo y frotis teñidos para diagnóstico de esporotricosis.

Los datos de las personas a las que se les aplicaron las intradermoreacciones se recopilaron en hojas de registro (Anexo).

1.3.2.- Aislamiento de S. schenckii a partir de fuentes naturales.

El aislamiento del hongo se realizó a partir de suelo y plantas. Las muestras se tomaron de las casas y propiedades cercanas de las personas que presentaron resultados positivos a la IDR celular, así como de otros sitios de las localidades estudiadas.

Las muestras de plantas seleccionadas para el estudio fueron 53 del municipio de Jicolapa y 41 de Progreso; 47 muestras de suelos del municipio de Jicolapa y 120 de Progreso. Se procesaron por alguno de los siguientes métodos:

a) Aislamiento por cultivo.

Se fragmentaron o maceraron 0.1 g de las plantas seleccionadas en trozos pequeños, en morteros, en condiciones estériles, realizando diluciones de las muestras: 1:10, 1:100 y 1:1000 en SSI.

Se suspendió 1 g de suelo en SSI estéril adicionada de penicilina y cloranfenicol para realizar diluciones de: 1:10, 1:100 y 1:1000. Se tomaron 0.5 ml de cada dilución de plantas y suelo, sembrando tanto en agar de Sabouraud simple como en agar micobiótico, incubando a 28°C/45 días.

b) Aislamiento por inoculación.

Se procesaron muestras de suelo de la manera descrita hasta la obtención de las diluciones, posteriormente se inocularon 0.5 ml de cada dilución a 3 ratones Balb/c, adultos, machos por vía intraperitoneal (IP). Los ratones se sacrificaron a los 60 días, extrayendo hígado, bazo y páncreas, realizando improntas y siembra por triplicado de cada órgano en agar glucosa Sabouraud y BHI, incubando a 28°C y 37°C/30 días respectivamente.

Todos los cultivos se revisaron periódicamente, realizando la identificación macroscópica, microscópica y obtención de la fase levaduriforme para S. schenckii.

II. - ESTUDIOS PATOGENICOS.

Se utilizaron cobayos Hartley, machos, adultos, de 500 g de peso y una cepa de S.schenckii CIM-ICUAP 6030.

2.1.- Inoculación Intraperitoneal.

La fase micelial se maceró en morteros en condiciones estériles para realizar una suspensión igual al tubo número 6 del nefelómetro de Mc. Farland. Se inocularon por vía Intraperitoneal (IP) 0.5 ml de esta suspensión a 30 cobayos. Se utilizó un grupo testigo de 6 cobayos con 0.5 ml de SSI por vía IP. En cada período de 3,6,9,12,15 y 20 días se sacrificaron 5 cobayos infectados y 1 control, extrayendo hígado, bazo, páncreas y riñones para hacer: frotis e histopatología con tinción de PAS. Posteriormente los órganos se sembraron por triplicado en BHI y agar glucosa Sabouraud, incubando a 37°C y 28°C por un período de 30 días.

2.2.- Inoculación Intratesticular.

A partir de la suspensión del hongo se inocularon 0.5 ml a 45 cobayos, como grupo testigo se inocularon 9 cobayos con 0.5 ml de SSI. Se sacrificaron 5 cobayos infectados y 1 testigo a los:1,2,4,6,8,10,12,14 y 20 días posteriores a la inoculación, separando testículos para realizar: frotis, histopatología con tinción de PAS y cultivo, sembrando por triplicado en BHI y agar glucosa Sabouraud, incubando a 37°C y 28°C durante 30 días.

III. - ESTUDIO DE PACIENTES CON ESPOROTRICOSIS.

La búsqueda de pacientes con esporotricosis se realizó en los centros de salud de Puebla, Guadalajara y el Distrito Federal, así como de las encuestas epidemiológicas que se realizaron en las 2 comunidades rurales.

Se estudiaron 10 pacientes con esporotricosis 3 de tipo fijo y 7 de tipo linfagítico, se hizo la historia clínica y se les aplicó esporotricina metabólica, se tomaron biopsias de lesiones activas para cultivo y para histopatología procesándolas con tinción de PAS e inmunofluorescencia para la búsqueda de las formas parasitarias de S.schenckii.

IV. - ESTUDIOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.

4.1.- Obtención de anticuerpos.

La obtención de anticuerpos fue a partir de conejos albinos, machos, adultos, a los cuales se les extajo 15 ml de sangre para la obtención de suero preinmune, posteriormente se les realizó el siguiente esquema de inmunización: El antígeno empleado para la inmunización de conejos se obtuvo a partir de levaduras de la cepa CIM-ICUAP 6030 de S. schenckii, de un cultivo de 96 horas en BHI mantenido a 37°C, posteriormente las levaduras se centrifugaron a 300g/15 minutos, se lavaron 3 veces con SSI, 2 veces con acetona, desecando el precipitado final durante 48 horas, el cual se disolvió en una proporción de 2 mg/ml de SSI.

Se aplicó 1 ml de antígeno por la vena marginal de la oreja el primer día, 1 ml el segundo día y 1 ml al tercer día durante la primera semana, la segunda semana se siguió el mismo esquema, sangrando a los conejos la tercera semana para la obtención de suero inmune. La comprobación de la presencia de anticuerpos se demostró por la observación de bandas de precipitación mediante las técnicas de inmunoelectroforesis e inmunodifusión.

La obtención de gamma globulinas de suero preinmune e inmune se realizó mediante 3 precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio sobresaturado con un pH de 7.8, disolviendo el precipitado final en solución salina amortiguada con boratos, eliminando el sulfato de amonio mediante diálisis en frío (4°C) contra solución salina amortiguada con boratos, el procedimiento de diálisis se mantuvo hasta la eliminación completa del sulfato, lo que se verificó por la adición de cloruro de bario a una muestra del dializado. La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Sedmak (Coomassie), ajustando la concentración de proteínas a 1gr/ml.

Las gamma globulinas de los sueros preinmune e inmune se almacenaron a -20°C hasta la realización de la técnica de inmunofluorescencia.

4.2.- Marcaje de gammaglobulinas con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Los sueros tanto preinmunes como inmunes, fueron adicionados con sulfato de amonio semisaturado, se determinó la cantidad de proteínas por el método de Bradford,

adicionando 0.05mg de isotiocianato de fluoresceína por cada mg de proteína, el FITC antes de ser agregado se disolvió en buffer carbonato-bicarbonato, pH 9.0 1:10 el volumen de la solución de proteínas. La mezcla resultante se agitó toda la noche en frío (0-5°C), dializando posteriormente contra PBS pH 7.2 durante 6-10 días a 0 - 5°C y merthiolate 1:10000 se agregó para conservar las globulinas marcadas, las cuales se almacenaron a 0 - 5°C.

4.3.- Método Directo.

Los cortes histológicos y las improntas de animales, así como los cortes histológicos de humanos fueron divididos en 4 secciones; la sección (a) se cubrió con el anticuerpo marcado con FITC, la (b) con globulinas normales marcadas (c) con la mezcla de partes iguales de anticuerpo marcado y no marcado y (d) con la mezcla de partes iguales de anticuerpo marcado y suero normal no marcado. Se incubaron a 37°C durante 30-60 minutos o toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Las laminillas fueron lavadas con PBS aproximadamente por 15 minutos, cambiando la solución 4 veces, fueron secadas en frío y una gota de glicerol con amortiguador se colocó sobre la muestra, colocando posteriormente el cubreobjetos.

4.4.- Método Indirecto.

Los cortes histológicos obtenidos de pacientes; las improntas y cortes histológicos de órganos de cobayos fué dividida en 3 secciones, colocando en (a) suero de paciente con esporotricosis, en (b) suero de conejo conteniendo anticuerpos y (c) con el suero normal del mismo origen animal. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda, que fue incubada a 37°C durante 30-60 minutos o a 4°C toda la noche. Posteriormente se lavaron con PBS aproximadamente por 15 minutos, cambiando la solución 4 veces. Se secaron con aire frío las preparaciones; las secciones a y b se cubrieron con IgG de suero normal humano o de conejo, conjugada con FITC, de acuerdo al origen animal y en (c) una mezcla de partes iguales de IgG de suero normal humano o de conejo conjugada con FITC e inmunoglobulina normal no marcada, las laminillas se incubaron, lavaron, secaron montando las preparaciones con glicerol con amortiguador, adaptando finalmente el cubreobjetos. Las preparaciones se observaron en microscopio de fluorescencia, utilizando controles positivos y negativos durante todo el procedimiento.

HOJA DE REGISTRO.

Fecha: Día ____ Mes ____ Año ____ Caso número ____

Nombre: _____

Sexo: Masculino ____ Femenino ____

Domicilio: _____

Ocupación: _____

Antecedentes:

a) Ha penetrado a grutas, cuevas o minas abandonadas:

Si ____ No ____

b) Ha sufrido traumatismos con vegetales: Si ____ No ____

tipo de vegetal: _____

c) Ha sufrido mordedura de animales: Si ____ No ____

tipo de animal: _____

d) Tipo de habitación: _____

e) Tipo de alimentación: _____

f) Ingiere bebidas alcohólicas: Si ____ No ____

g) Está bajo algún tratamiento: Si ____ No ____

Especifique: _____

Intradermorreacción en brazo derecho (UNAM):

a) Lectura a las 24 horas: Positivo ____ Negativo ____

b) Lectura a las 48 horas: Positivo ____ Negativo ____

Intradermorreacción en brazo izquierdo (INDRE):

a) Lectura a las 24 horas: Positivo ____ Negativo ____

b) Lectura a las 48 horas: Positivo ____ Negativo ____

Intradermorreacción con esporotricina metabólica.

a) Lectura a las 24 horas: Positivo ____ Negativo ____

b) Lectura a las 48 horas: Positivo ____ Negativo ____

RESULTADOS

I. - ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS.

1.1. - Zona geográfica estudiada.

1.- Jicolapa se ubica en el municipio de Zacatlán, sus coordenadas son los paralelos: 19° 50'06" y 20°08'12" de latitud norte y los meridianos 97°51'06" y 98°12'36" de longitud occidental, tiene una superficie de 512.32 Km². Este distrito se localiza dentro de la zona de los climas templados, presentando un incremento de humedad conforme se avanza al norte, el centro del distrito presenta un clima húmedo con abundantes lluvias en verano, una temperatura media anual entre 12 y 18°C, con precipitación menor de 40mm en el mes más seco; presenta grandes extensiones de bosques de coníferas, principalmente de pinos, asociaciones boscosas de pino-encino y mesófilo de montaña, pino blanco, madroño, oyamel, ocote blanco, pino chino.

La población total del municipio es de 55 513 habitantes, con las siguientes actividades: agricultura de maíz y frijol, fruticultura con producción de manzana, durazno, pera y nogal; se elabora sidra y vino, tejidos de lana.

2.- Progreso se localiza en el municipio de Teztlutlán, sus coordenadas geográficas son los paralelos 19°36' y 20°14' de latitud norte y los meridianos 97°05' y 97°44'; presenta una altitud de 400m y máxima de 2491m sobre el nivel del mar. Tiene una superficie de 84.2Km², el municipio se localiza en la transición de los climas templados de la sierra norte a los cálidos del declive del golfo, clima semicálido, subhúmedo con lluvias todo el año, una temperatura media anual mayor de 18° y de -3°C y 18°C del mes más frío, con una precipitación mayor de 40mm del mes más seco; tiene una población de 354 094 habitantes, que se dedican al cultivo de maíz, frijol, café, naranja, caña de azúcar, producción de maderas finas, pino y roble.

1.2.- Obtención de esporotricina celular.

Los resultados de las pruebas de termotolerancia para inactivar a S.schenckii muestran que el hongo es capaz de crecer a 60°C desde el inicio del periodo de incubación hasta los 20 minutos, a los 25 minutos se obtuvo una sobrevivencia del 50% y a partir de los 30 minutos el hongo es incapaz de sobrevivir. Tabla 1; siendo imposible recuperar por cultivo al hongo en los medios empleados: BHI, tioglicolato y Sabouraud.

1.3.- Encuesta Epidemiológica.

1.3.1.- Aplicación del antígeno celular.

La antigenicidad de la esporotricina levaduriforme proporcionada por el INDRE, así como la elaborada para este estudio en la UNAM, fue muy similar, correlacionándose las respuestas positivas y negativas entre ambos antígenos en todos los pacientes estudiados.

En Jicolapa, Zacatlán, se aplicaron las pruebas cutáneas a 133 individuos, pudiéndose observar en la Tabla II que la frecuencia global de positividad a la esporotricina es de 15.03% (20 individuos) en los grupos de edad de 16-30 años, se observaron las frecuencias más altas y en el de 61 o más fueron las más bajas.

La tabla III muestra un franco predominio de positividad a la esporotricina levaduriforme del sexo femenino (12.03%) sobre el al masculino (3.0%).

En cuanto a la ocupación la tabla IV indica que las personas dedicadas al hogar presentan una mayor frecuencia de positividad a la I.D.R. (10.52%), seguida de estudiantes y campesinos, obteniendo resultados negativos en individuos de otras actividades. La aplicación posterior de la esporotricina metabólica a las personas que mostraron prueba positiva al antígeno celular fue negativo para 19 y solo 1 fue positiva, en un hombre de grupo de edad de 16 - 30 años, campesino.

En Progreso, Teziutlán se estudiaron 237 personas a través de la I.D.R. La tabla V muestra una frecuencia global muy baja (2.52%) en relación a la otra población, indicando un ligero predominio de positividad a la esporotricina celular en los grupos de edades de 16-30 y 31-45 años.

En ésta población el sexo femenino también mostró un predominio de positividad (2.10%) respecto al masculino (0.42%) (Tabla VI).

La tabla VII muestra que los campesinos y las personas dedicadas al hogar fueron los únicos tipos de ocupación con I.D.R. positivas. La aplicación de esporotricina metabólica fue negativa para todas las personas.

1.3.2.- Aislamiento de S.schenckii a partir de fuentes naturales.

En la tabla VIII se observa que en la población de Jicolapa Zacatlán se aisló al hongo en 4 de 47 muestras de suelo procesadas: correspondiendo 1 cepa a 1 suelo de rosal, 1 de dalia, 1 de clavel y 1 de un chayoquellite. La Tabla IX muestra el número de aislamiento a partir de 53 plantas procesadas se aisló S.schenckii a partir de 4 plantas siendo 3 de rosales y 1 de un clavel. El total de aislamientos de S.schenckii a partir de fuentes naturales en esta población fue de 8 (4 de suelos y 4 de plantas) a partir de 100 muestras (figura 2a).

Para la población de Progreso Teztlutlán la Tabla X indica la recuperación de 7 cepas del hongo a partir de suelos (4 de suelo de cafetales, 2 de suelo de naranjos y 1 del interior de una casa) a partir de 120 muestras de suelo procesadas, lo que correspondió al 5.79% de aislamientos. No se logró el aislamiento del hongo en ninguna de las 41 plantas estudiadas. Por lo que los aislamientos de S.schenckii a partir de un total de 161 muestras de fuentes naturales en esta población, fue solamente en 7 suelos, cifra muy baja en comparación con los aislamientos de Zacatlán.

Todas las cepas aisladas de S.schenckii presentaron la misma morfología macroscópica y microscópica, correspondiendo al tipo de cepas albinas (figura 2a,c y d).

II. - ESTUDIOS PATOGENICOS.

2.1.- Estudio en cobayos.

2.1.1.- Inoculación Intra-peritoneal.

Mediante Improntas e histopatología se anota en la tabla XI que en los animales sacrificados a los 3 días ya se observaron estructuras levaduriformes de S.schenckii en hígado; a los 6 días también fueron observadas en bazo, páncreas y riñón (Figs. 3 a - h y 4 a - h) y de los 12 días en adelante las estructuras parasitarias fueron muy abundantes en todos los órganos estudiados.

La recuperación por cultivo de S.schenckii se muestra en la tabla XII. A los 3 días no se pudo aislar al hongo en forma irregular, ya que en algunos animales desarrollaba el hongo, mientras que en otros no, a los 6 días se recuperó constantemente de hígado, bazo, riñón y páncreas.

2.1.2.- Inoculación Intratesticular.

En la tabla XIII se puede observar tanto la presencia de formas parasitarias del hongo en las improntas e histopatología como la recuperación por cultivo. El primer día no es posible recuperar ni observar las estructuras parasitarias del hongo; a los 2 días los cultivos son positivos y empiezan a observarse las formas parasitarias, y a partir de los 4 días se recuperan por cultivo y observan las estructuras parasitarias de S.schenckii en forma muy abundante en las Improntas (Figs.5 a - h); sin embargo en los cortes histológicos estas formas son muy abundantes.

Tanto en la inmunofluorescencia directa como en la indirecta se observaron las estructuras parasitarias del hongo, en forma intracelular y extracelular desde el primer día de observación hasta el fin del experimento, en todos los órganos estudiados (hígado, bazo, páncreas, riñón y testículos). Tabla XIV. (Figs. 7 a - e).

Mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta se observaron elementos parasitarios en forma mucho mas abundante que por la técnica de Inmunofluorescencia directa.

III.- Estudio de pacientes con esporotricosis.

3.1.- Estudios de Histopatología, cultivo, Intradermorreacción e Inmunofluorescencia.

En la tabla XIV se muestran los datos epidemiológicos y el tipo clínico de esporotricosis correspondientes a cada uno de los 10 pacientes estudiados, en donde se nota que predominó la forma linfagítica (7 de 10).

La demostración de las levaduras en los tejidos mediante inmunofluorescencia directa e indirecta fue positiva en todos los casos. La I.D.R. con antígeno polisacárido de S. schenckii solamente fue positiva en 5 casos (fig.1 f).

La observación microscópica de las formas parasitarias y la recuperación por cultivo de S. schenckii son mostradas en la tabla XVI, la cual indica que de los 10 pacientes estudiados, se observaron, mediante los estudios de histopatología las estructuras parasitarias del hongo en 6 casos, y en 9 de las 10 muestras estudiadas, fue posible recuperar por cultivo el hongo.

En las figuras 6 c - f se observan las formas parasitarias del hongo, a partir de cortes histopatológicos teñidos con PAS de 4 muestras positivas; y en a y b se observan 2 casos clínicos de esporotricosis.

TABLA I

Prueba de termotolerancia (60° C) para observar la viabilidad de levaduras de S. schenckii.

Tiempo (minutos)	% de Supervivencia
5	100
10	100
15	100
20	100
25	50
30	0
35	0
40 - 120	0

TABLA II**Frecuencia de positividad a la esporotricina celular, según la edad en Jicolapa, Zacatlán.**

Edad (años)	No. de individuos	IDR (+)	%
0 - 15	51	6	4.52
16 - 30	38	8	6.01
31 - 45	31	3	2.25
46 - 60	10	2	1.50
≥61	3	1	0.75
Total	133	20	15.03

TABLA III**Frecuencia de positividad a la IDR celular en relación al sexo en Jicolapa, Zacatlán.**

Sexo	No. de Individuos	IDR(+)	%
Masculino	37	4	3.0
Femenino	96	16	12.03
Total	133	20	15.03

TABLA IV**Frecuencia de positividad a la IDR celular, según la ocupación en Jicolapa, Zacatlán.**

Ocupación	No. de individuos	IDR (+)	%
Hogar	86	14	10.52
Estudiante	34	4	3.01
Campesino	8	2	1.5
Profesor	2	0	0
Albañil	2	0	0
Panadero	1	0	0
Total	133	20	15.03

TABLA V**Frecuencia de positividad a la IDR celular, según la edad en Progreso, Teztlután.**

Edad(años)	No. de individuos	IDR (+)	%
0 - 15	158	1	0.42
16 - 30	49	2	0.84
31 - 45	18	2	0.84
46 - 60	11	1	0.42
61	1	0	0
Total	237	6	2.52

TABLA VI

Frecuencia de positividad a la IDR celular en relación al sexo en Progreso, Teztlutlán.

Sexo	No. de individuos	IDR (+)	%
Masculino	98	1	0.42
Femenino	139	5	2.10
Total	237	6	2.52

TABLA VII

Frecuencia de positividad a la IDR celular, según la ocupación en Progreso, Teztlutlán.

Ocupación	No. de individuos	IDR (+)	%
Hogar	106	2	0.84
Estudiante	87	0	0
Campesino	36	4	1.68
Profesor	4	0	0
Cafetalero	2	0	0
Ordeñador	1	0	0
Enfermera	1	0	0
Total	237	6	2.52

TABLA VIII**Frecuencia de aislamiento de S.schenckii a partir de suelo en Jicolapa, Zacatlán.**

Tipo de suelo	No. de muestras	No. de aislamientos	%
Rosal	21	1	2.12
Bugambilia	1	0	0.00
Dalia	3	1	2.12
Clavel	2	1	2.12
Chayoquelite	1	1	2.12
Otros	19	0	0.00
Total	47	4	8.51

TABLA IX

Frecuencia de aislamiento de S.schenckii a partir de plantas en Jicolapa, Zacatlán.

Tipo de planta	No. de muestras	No. de aislamientos	%
Rosal	21	3	8.33
Bugambllia	1	0	0.00
Clavel	5	1	2.77
Dalla	3	0	0.00
Otros	23	0	0.00
Total	53	4	11.11

TABLA X

Frecuencia de aislamiento de S.schenckii a partir de suelo en Progreso, Teztlutlán.

Tipo de suelo	No. de muestra	No. de aislamientos	%
Cafetal	70	4	3.32
Naranja	31	2	1.66
Rosal	3	0	0.00
Bugambilla	3	0	0.00
Patio	6	0	0.00
Interior	7	1	0.83
Total	120	7	5.79

TABLA XI

Tiempo de aparición de las formas parasitarias de *S.schenckii* durante el proceso evolutivo de la infección en improntas y cortes histológicos en cobayos inoculados por vía intraperitoneal.

Tiempo (días)	Hígado		Bazo		Páncreas		Riñón	
	Imp	Histo	Imp	Histo	Imp	Histo	Imp	Histo
3	±	±	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	±	+	±	+	±
9	+	+	+	+	+	+	+	+
12	++	++	++	++	++	++	++	++
15	++	++	++	++	++	++	++	++
20	++	++	++	++	++	++	++	++

- No se observan
 ± Formas escasas
 + Abundantes
 ++ Muy abundantes

Imp.: Improntas
 Histo.: Histopatología

TABLA XII

Recuperación de *S. schenckii* por cultivo a diferentes tiempos de la infección, en cobayos inoculados por vía intraperitoneal.

Tiempo (días)	Hígado	Bazo	Páncreas	Riñón
3	±	±	±	±
6	+	+	+	+
9	+	+	+	+
12	+	+	+	+
15	+	+	+	+
20	+	+	+	+

± En ocasiones se recupera por cultivo

TABLA XIII

Observación microscópica y recuperación por cultivo de las formas parasitarias de *S. schenckii* durante el proceso evolutivo de la infección en cobayos inoculados por vía intratesticular.

Tiempo (días)	Impronta	Histopatología	Cultivo
1	-	-	-
2	±	-	±
4	+	±	+
6	+	±	+
8	+	±	+
10	++	+	+
12	++	+	+
14	++	+	+
20	++	+	+

- No se observa o no se recupera por cultivo

± Se observa en forma escasa o se recupera irregularmente por cultivo

+ Abundantes

++ Muy abundantes

TABLA XIV

Observación microscópica de los elementos parasitarios de S. schenckii, Intra y extracelularmente mediante inmunofluorescencia directa (I.F.D) e Indirecta (I.F.I) durante el proceso evolutivo de la infección en cobayos inoculados por vía intratesticular e intraperitoneal, en cortes histológicos e improntas.

Tiempo (días)	Hígado		Bazo		Páncreas		Riñón		Testículos	
	I.F.D	I.F.I	I.F.D	I.F.I	I.F.D	I.F.I	I.F.D	I.F.I	I.F.D	I.F.I
1	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
2	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
3	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
4	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
6	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
8	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
10	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
12	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
14	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
15	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
20	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++

+ se observa en forma abundante

++ muy abundante

I.F.D. Inmunofluorescencia directa

I.F.I. Inmunofluorescencia indirecta

TABLA XV

Principales características de los casos clínicos de esporotricosis.

caso número	Sexo	Edad años	Ocupación	Procedencia	Tipo Clínico	Tiempo de Evolución
1	M	30	Campesino	Jalisco	Linfangítica espalda	7 meses
2	F	13	estudiante	Jalisco	fija pierna der.	3 semanas
3	F	23	hogar	Jalisco	linfangítica brazo izq.	3 años
4	F	47	hogar	Jalisco	linfangítica dorso de mano	3 meses
5	M	69	campesino	Jalisco	linfangítica pierna der.	6 años
6	M	15	agricultor	Zacatecas	fija brazo der.	11/2 meses
7	F	42	campesino	Jalisco	fija dedo índice	2 meses
8	F	51	hogar	Jalisco	linfangítica brazo izq.	8 meses
9	F	47	hogar	Jalisco	linfangítica dorso de mano	1 año
10	F	45	campesino	Puebla	linfangítica espalda	6 meses

TABLA XVI

Diagnóstico de esporotricosis mediante: Cultivo, IDR, IF e Histopatología.

No. de Paciente	Histopatología PAS	Cultivo	I.D.R.	I.F.D.	I.F.I.
1	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+
3	-	+	+	+	+
4	+	+	-	+	+
5	-	+	-	+	+
6	+	-	-	+	+
7	+	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+
9	-	+	-	+	+
10	+	+	-	+	+
No. de (+)	6	9	4	10	10
No. total	10	10	10	10	10

+ Se recupera por cultivo o se observan las formas parasitarias.

- No se recupera por cultivo, ni se observan las estructuras parasitarias.

IDR intradermoreaccin

IFD inmunofluorescencia directa e indirecta IFI

LISTA DE FIGURAS

Figura 1

- a y b) Panorama de la población de Jicolapa, Zacatlán Puebla.
- c y d) Panorama de la población de Progreso, Teztlutlán Puebla.
- e) Habitantes de la población de Progreso, Tez. Puebla.
- f) IDR positiva.

Figura 2

- a) Cultivos de S. schenckii obtenido de suelo y plantas.
- b) Cultivos de S. schenckii obtenidos de órganos de cobayos.
- c) Morfología microscópica de la fase micelial de S. schenckii.
- d) Morfología microscópica de la fase levaduriforme de S. schenckii.

Figura 3

Observación microscópica de S. schenckii en cortes histológicos teñidos con PAS, de órganos de cobayos.

- a) Levadura gemante en hígado de 12 días.
- b) Levadura oval en hígado de 9 días.
- c) Levaduras simples y gemantes en bazo de 9 días.
- d) Levaduras ovals y redondas en bazo de 20 días.
- e) Levadura en riñón de 15 días.
- f) Levadura redonda en riñón de 12 días.
- g) Cuerpo en cigarro y levadura redonda en páncreas de 12 días.

Figura 4

Observación microscópica de S. schenckii en improntas de órganos teñidos con PAS.

- a) Levaduras gemantes en hígado de 6 días.
- b) Levadura gemante en hígado de 9 días.
- c) Micelio y levaduras en bazo de 3 días.
- d) Micelio en bazo de 3 días.
- e) Levadura oval en riñón de 15 días.
- f) Levadura gemante en riñón de 20 días.
- g) Levaduras en páncreas de 20 días.
- h) Levaduras ovals y cuerpos en cigarro.

Figura 5

Observación microscópica de S. schenckii en improntas y cortes histológicos de testículos teñidos con PAS.

- a) Impronta de 2 días que muestra micelio.
- b) Impronta de 2 días que muestra: micelio, tubos germinales y levaduras.
- c) Impronta de 2 días que muestra la etapa de transición micelio-levadura.
- d) Etapa de transición micelio-levadura en Impronta de 2 días.
- e) Levaduras en impronta de 2 días.
- f) Cuerpos en cigarro, levaduras ovales y redondas en impronta de 6 días.
- g) Levaduras redondas en corte histológico de 6 días.
- h) Levaduras ovales y redondas en corte histológico de 8 días.

Figura 6

Aspectos clínicos y cortes histológicos teñidos con PAS obtenidos de pacientes.

- a) Esporotricosis linfagítica en pierna.
- b) Esporotricosis fija en brazo.
- c) Levadura redonda.
- d) Levadura ovalada.
- e) Levadura gemante.
- f) Cuerpo en cigarro.

Figura 7

Observación microscópica de S. schenckii mediante Inmunofluorescencia.

- a) Levaduras observadas mediante IFI.
- b) Levaduras ovales y redondas observadas con IFI.
- c) Levaduras redondas observadas con IFD.
- d) Levaduras redondas observadas con IFD.
- e) Levaduras ovales y redondas observadas con IFI.

Figura 8

Observación microscópica de cortes histológicos de pacientes con IFI.

- a) Levaduras intracelulares, puntiformes y cuerpos en cigarro de S. schenckii.
- b) Estructuras puntiformes, intracelulares, levaduras ovales y redondas de S. schenckii.

FIGURA 1

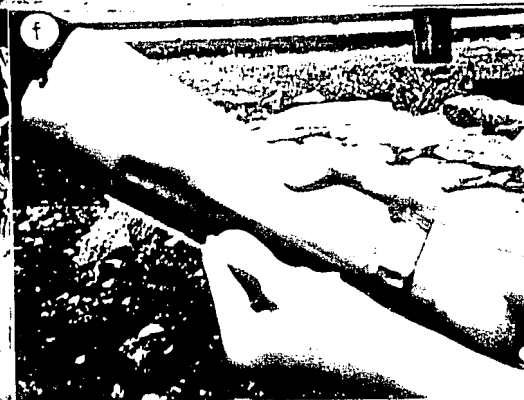
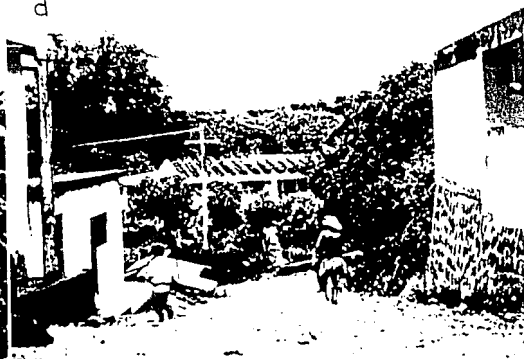


FIGURA 2

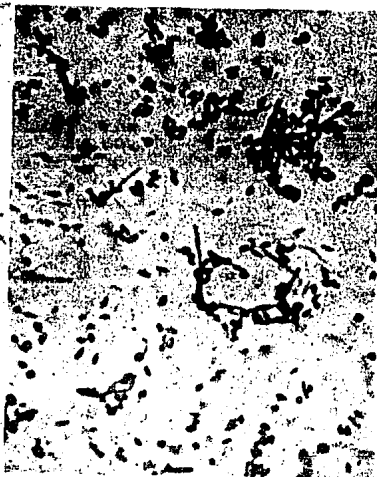
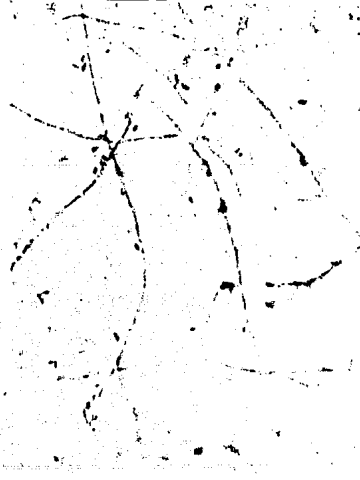
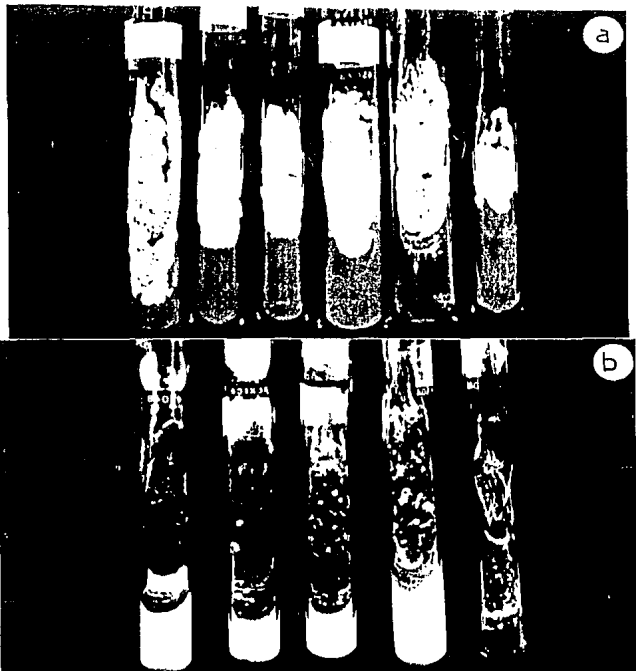
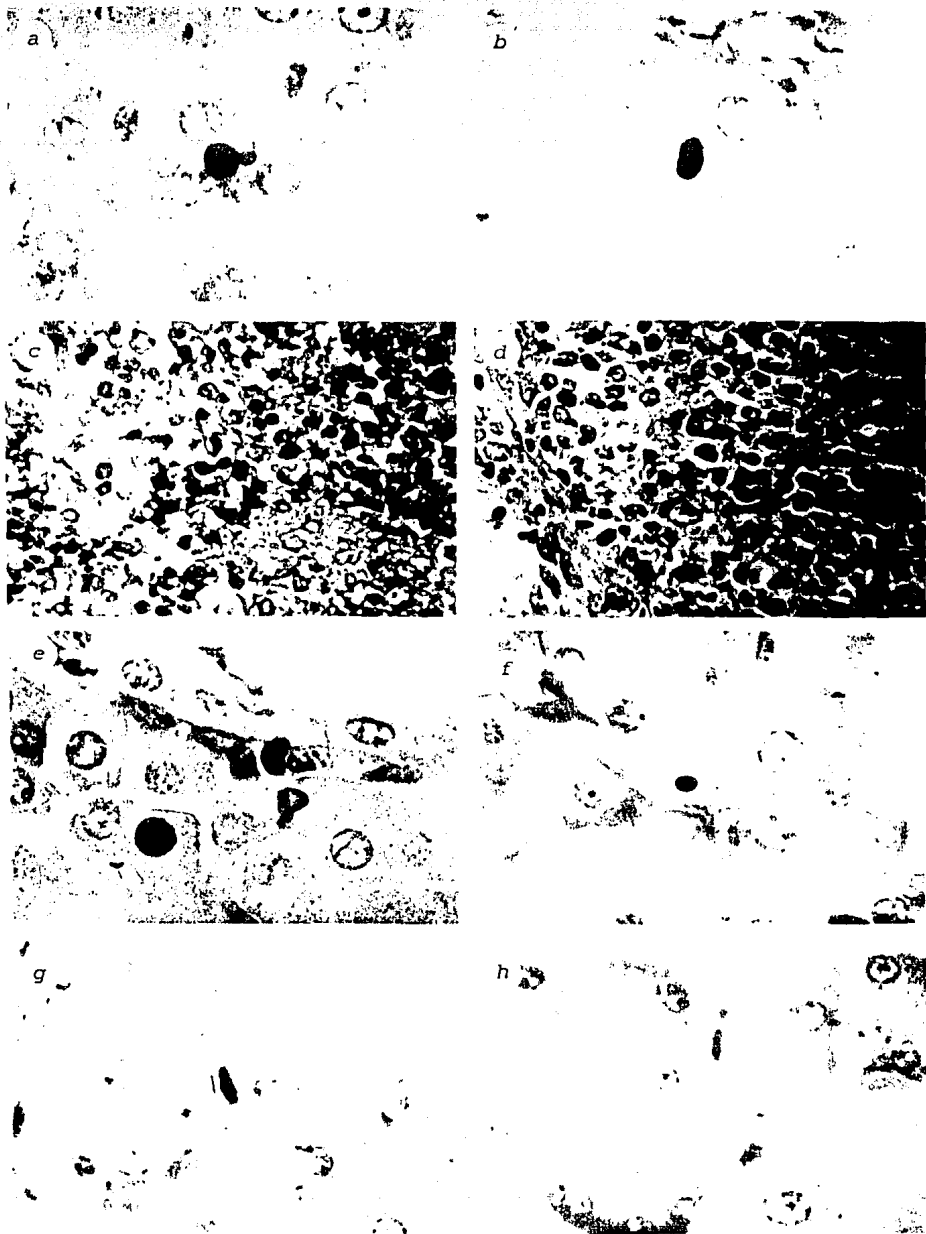
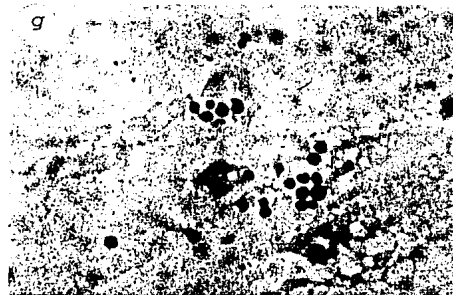
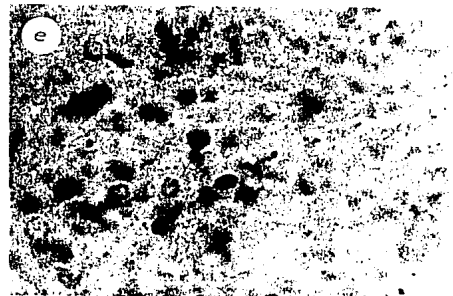
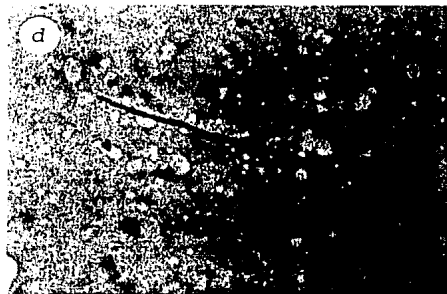
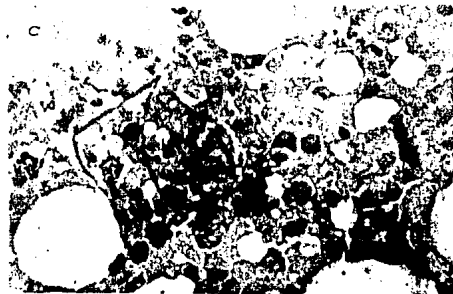
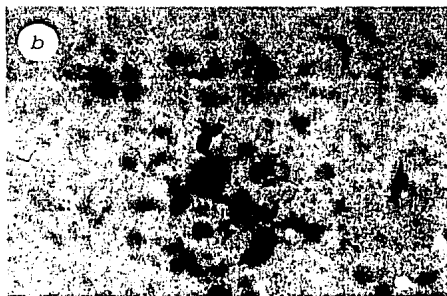


FIGURA 3





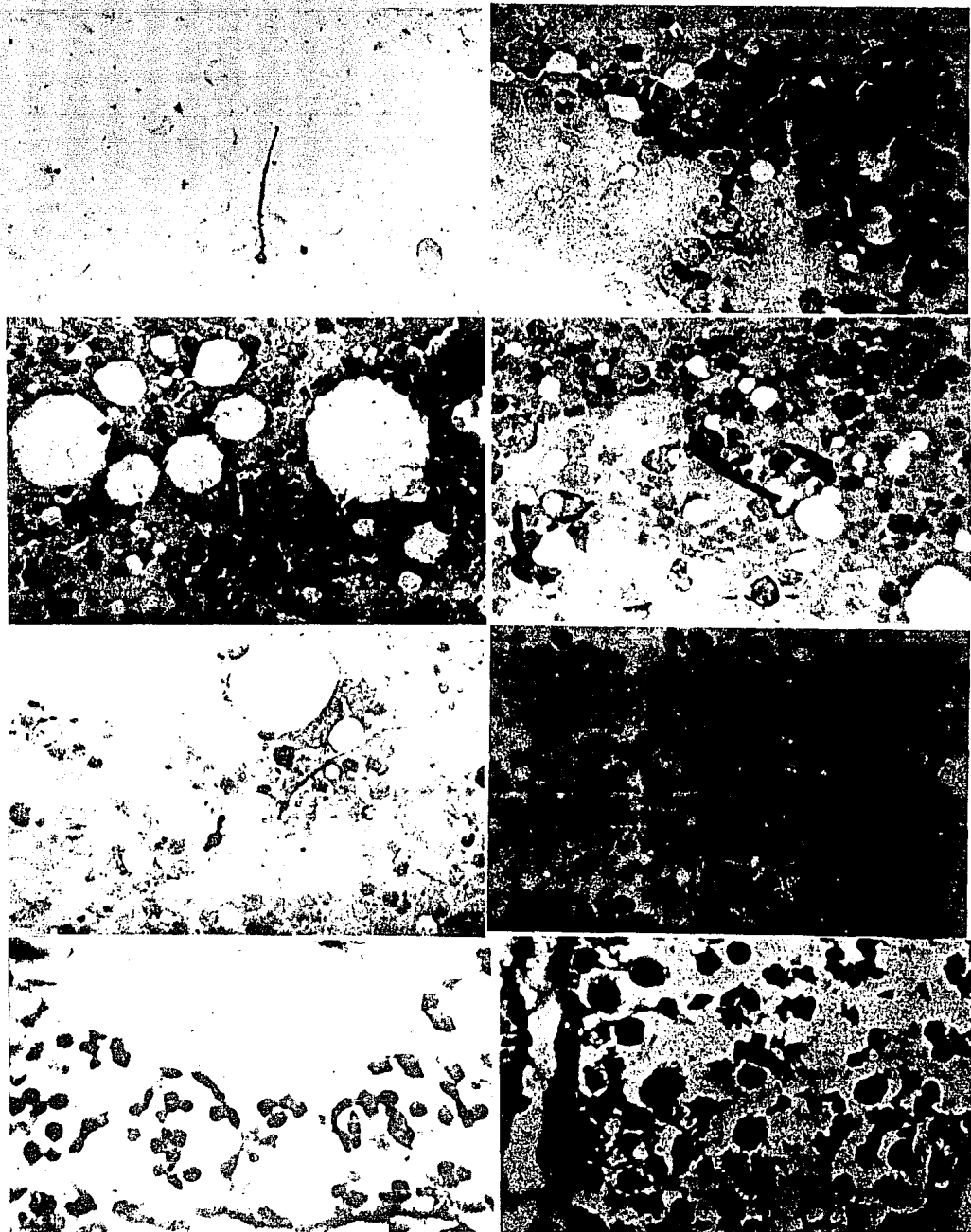
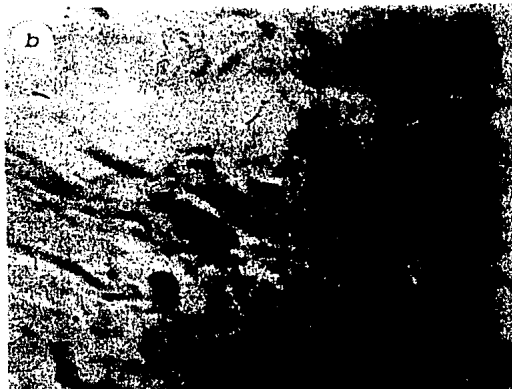
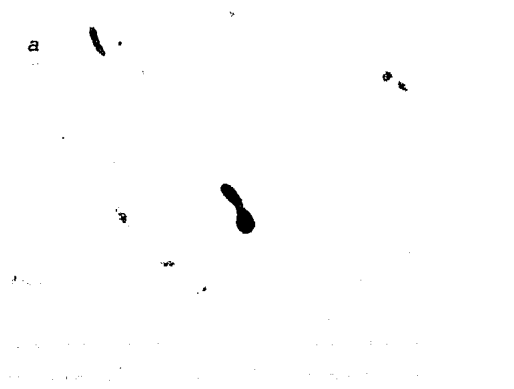
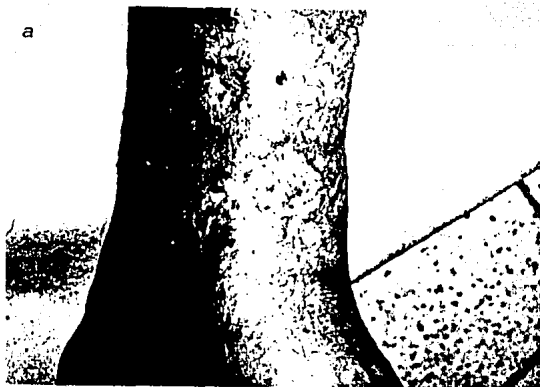
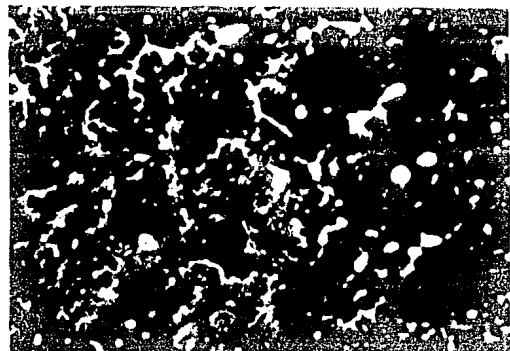
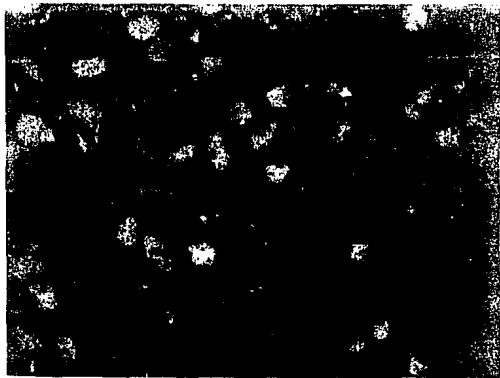
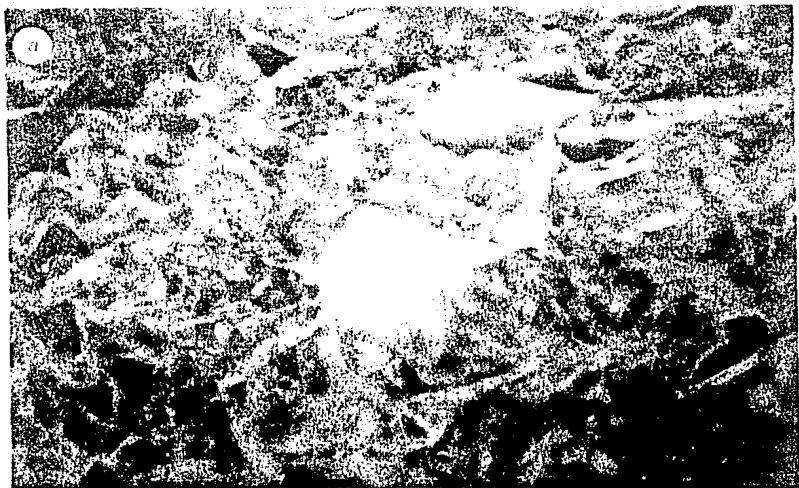
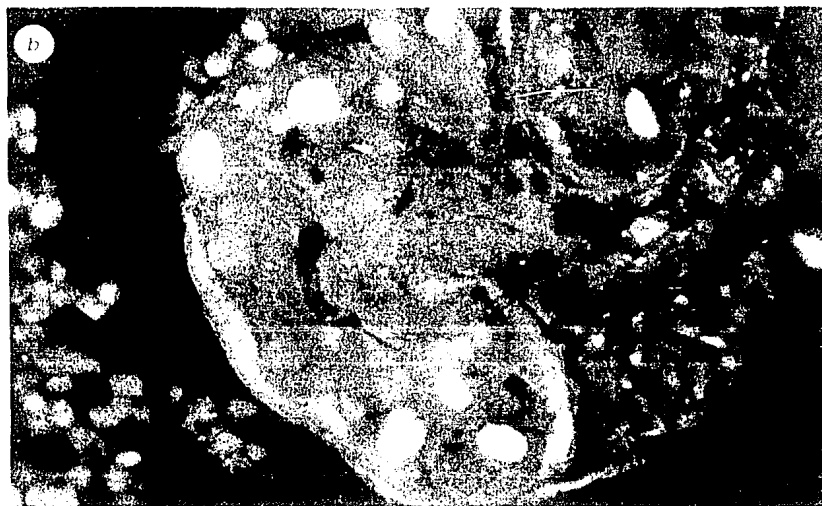
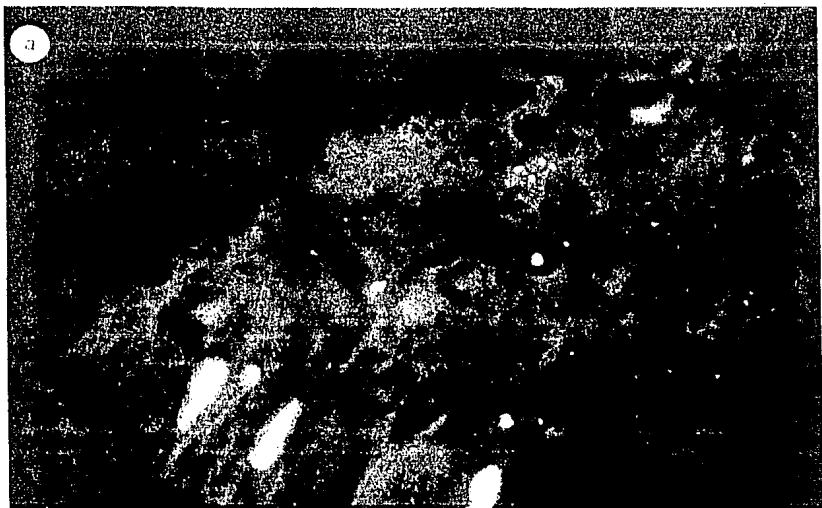


FIGURA NO. 6







DISCUSION

La esporotricosis es considerada actualmente la micosis subcutánea más frecuente en México (González-Ochoa 1981); siendo Puebla uno de los estados en donde se presenta esta micosis en forma endémica, como lo han constatado, Lavalle en 1975; González-Ochoa y Velasco Castrejón en 1976, quienes encuentran que las poblaciones de Xicotepec, Necaxa, Huauchilango, Xaltepuxtla, y San Pedro Petlacolla.

Con base a lo anterior y con la finalidad de conocer la prevalencia de esta micosis se seleccionaron dos comunidades: Jicolapa, una comunidad relativamente cercana a las zonas consideradas como endémicas para la esporotricosis y Progreso localizada fuera de esta zona. Con este estudio se pretendió contribuir a los conocimientos epidemiológicos de la esporotricosis, en el sentido de marcar las diferencias en la prevalencia de esta micosis entre 2 zonas diferentes, así como correlacionar con los hallazgos del hongo en el hábitat natural.

En la zona endémica (Jicolapa) se encontró una frecuencia de reactividad a la esporotricina del (15.0%) significativamente mayor a la encontrada en Progreso población no endémica la cual fue del 2.5%.

Similares resultados refieren diferentes autores al estudiar zonas endémicas y no endémicas de esporotricosis, como los de Mayorga y cols. en 1979, quienes encontraron una baja frecuencia de reactores a la esporotricina en la ciudad de Guatemala en relación a la laguna de Ayarza, en donde se presentó una mayor frecuencia. En Perú en 1971 Geldres y cols. encuentran baja reactividad a la esporotricina en la región de Otuzco y el 0% en Palján.

En este estudio se demostró la correlación entre la frecuencia de reactividad a la esporotricina y la presencia de S. schenckii en la naturaleza; las bajas frecuencias de aislamiento en Progreso eran esperados, ya que esta localidad no presenta las condiciones ecológicas favorables para el hábitat de S. schenckii, al ser una zona semitropical, cafetalera y productora de cítricos, su temperatura es de 15° a 18°C y la humedad del 90 al 95% y una altitud de 400 a 2491 m, en cambio Jicolapa, una comunidad de clima templado con abundantes plantas espinosas de ornato, como bugambillas y rosales; es una región frutícola y productora de maíz, con una temperatura de 12° a 20°C y humedad del 90%. Lo anterior concuerda con lo descrito por Rippon que menciona que S. schenckii se encuentra en la naturaleza se encuentra en zacate, paja, forraje, madera, musgo, suelo, claveles, bugambillas y rosas. Generalmente habitan en climas templados y húmedos con temperatura promedio de 15° a 20°C y humedad relativa del 90.0% (Mackinnon 1969).

El presente estudio mostró un ligero predominio del sexo femenino de la reactividad a la esporotricina, esto puede ser debido a que las mujeres también desempeñan actividades agrícolas como la recolección de varas y leña para el hogar; además del arreglo y cuidado de jardines y huertos familiares, sitios en donde puede presentarse S. schenckii. A diferencia de nuestros hallazgos la literatura menciona que la frecuencia de reactividad a la esporotricina es mayor en el sexo masculino (Lavalle 1979, Rippon 1988); Colscou 1978 y González-Ochoa (1979) demuestran que la positividad a la esporotricina fue más frecuente en las ocupaciones de labores del hogar, estudiantes y campesinos.

S. schenckii se considera un organismo no exigente en requerimientos nutricionales y que se recupera fácilmente de suelo y plantas (Mackinnon 1969; Lavalle 1979), sin embargo en algunas ocasiones la búsqueda del hongo a partir de fuentes naturales ha sido negativo (Geldres 1973; Mayorga y cols. 1979). Estas diferencias podrían ser debidas entre otros factores a la selección de las muestras, a las técnicas de aislamiento o al tipo de región estudiada.

El aislamiento de S. schenckii en las dos comunidades a partir de vegetales y suelo indica un mayor número de recuperación de cepas del hongo en Jicolapa (una zona endémica), sitio en donde se presentó el mismo número de aislamientos a partir de suelos y plantas. En este mismo lugar la frecuencia de reactividad a la esporotricina fue del 15.0%, en cambio en Progreso (zona no endémica) los aislamientos fueron menores; la frecuencia de reactividad a la esporotricina fue solamente del 2.5%.

En este estudio se aisló al parecer por primera vez S. schenckii a partir de suelo asociado a cafetos y naranjos, así como de una daila.

Como se esperaba los rosales y claveles fueron las plantas que presentaron una mayor frecuencia de aislamientos de S. schenckii, ya que se consideran los vegetales en donde habita el hongo (Benham y Kesten 1932, González-Ochoa 1979).

En el humano las lesiones de esporotricosis inician con la introducción de S. schenckii en forma de hifas y conidios; posteriormente en los sitios de entrada ocurre la fagocitosis por pmn y la transformación a la forma parasitaria, y finalmente se lleva a cabo la reproducción de las levaduras. La conversión de elementos hifales a levaduriformes es una etapa crucial para el establecimiento del hongo en ésta micosis; se considera que el período necesario para el establecimiento del hongo en general es de 7 a 10 días (González-Ochoa 1979; Rippon 1988).

S. schenckii es uno de los hongos dimórficos cuya transformación de la fase micelial a la levaduriforme es rápida. En este trabajo se pudo apreciar mediante la infección experimental que el establecimiento de la infección ocurre a los 6 días; sin embargo la transformación de los elementos miceliales a levaduriformes es rápida, ya que fue posible

encontrar elementos parasitarios de S.schenckii a los 3 días en animales cuya vía de infección fue intraperitoneal. A las 48 horas cuando la vía de entrada fue intratesticular se encontraron escasos elementos parasitarios y a los 4 días fue posible encontrar un mayor número de estructuras parasitarias, además elementos hifales y etapas de transición micelio-levadura.

La localización y frecuencia de estructuras fúngicas varía de órgano a órgano y de animal a animal, el número de elementos fúngicos es proporcional al tiempo transcurrido posterior a la infección experimental (Okudaira 1960). Por los resultados obtenidos en este trabajo el cobayo fue el animal que mostró mayor susceptibilidad para la infección experimental con S.schenckii, el cual requirió menos de seis días para desarrollar la infección diseminada.

Fue notorio observar que la morfología parasitaria fue muy polimórfica ya que en las Improntas realizadas de los órganos procesados, mostraron la presencia de levaduras simples, ovales, redondas, gemantes, en cigarro, tubos germinales, micelio. La transición micelio - levadura solo se observó en las Improntas de testículos de cobayo. En cortes histológicos la variedad en el polimorfismo de las distintas estructuras fúngicas de órganos de rata y cobayo fue menor en relación a las Improntas y no se observó la transición micelio-levadura en los cortes histológicos de testículos de cobayos.

A diferencia de las inoculaciones experimentales con Candida albicans donde el riñón es el más susceptible a la invasión, en las infecciones por S.schenckii el riñón requiere aproximadamente 3 semanas para poder presentar los elementos parasitarios del hongo, y siendo estos escasos (Moore y Ackerman 1946). Similares hallazgos se observaron en este estudio.

A través de los cultivos de los fragmentos de tejidos se logró recuperar al hongo en el siguiente orden cronológico decreciente: hígado, páncreas, bazo, y riñón; en este último órgano, como en las Improntas, y en los cortes histológicos, S.schenckii fue muy escaso.

Los cuerpos asteroides no se observaron en los órganos estudiados, posiblemente el tiempo requerido para su formación es mayor como lo indica Okudaira y col. 1960. El tiempo de duración de este estudio que fue solamente de 20 días.

Como es del conocimiento general, la histopatología no es el procedimiento más adecuado para el diagnóstico de la esporotricosis, ya que generalmente no se observan elementos parasitarios, o bien éstas son escasas (González Ochoa 1950, Rippon 1988). Sin embargo algunos investigadores como Rodríguez Toro 1985, Hiruma y Kagawa 1983 consideran que la visualización de dichas estructuras no es tan escasa como se piensa,

tal vez esta diferencia se deba a las formas clínicas de la esporotricosis y a las técnicas de coloración aplicadas.

En este estudio, de las muestras de 10 pacientes procesadas por histopatología con tinción de PAS, fue posible observar en 6 muestras estructuras de S.schenckii; correspondiendo éstas a levaduras ovals, simples o con blastoconidios. No obstante la presencia de los elementos parasitarios fue escasa. Por otra parte fue en los pacientes con evolución de la esporotricosis menor de un año en donde se observaron las estructuras parasitarias y en los que la esporotricosis fue tipo linfático.

Una buena alternativa para la observación de los elementos fúngicos en muestras de pacientes es la utilización de inmunofluorescencia, la cual según Kaplan 1960 y González Ochoa 1967, muestran al hongo con más facilidad al utilizar esta técnica.

En este estudio se observaron estructuras fúngicas en todas las muestras de pacientes con esporotricosis las cuales variaron en tamaño, forma y cantidad, siendo éstas, estructuras en forma de cigarro, levaduras simples, gemantes y abundantes elementos puntiformes. Las formas parasitarias de S.schenckii se presentaron intra y extracelularmente, siendo las estructuras intracelulares las más frecuentes.

La reacción de inmunofluorescencia indirecta se ha utilizado para el diagnóstico de la esporotricosis en pacientes sobre todo a partir de exudados de las lesiones donde se observan con claridad los elementos levaduriformes (Tompson 1977 y González Ochoa 1967), aún cuando éstos suelen ser muy escasos.

La inmunofluorescencia indirecta y directa practicada en cortes histológicos de pacientes, reveló una considerable abundancia de elementos fúngicos que incluyeron: estructuras puntiformes, levaduras en forma de cigarro, ovals y gemantes.

Por otra parte la inmunofluorescencia directa e indirecta realizada en los diferentes órganos de los cobayos inoculados con S.schenckii; demostraron una mayor abundancia y variedad de elementos en los cortes histológicos que en las improntas.

De lo anterior se deduce que la inmunofluorescencia indirecta en cortes histológicos de tejidos afectados por S.schenckii, pone de manifiesto a las estructuras parasitarias convencionales (levaduras y cuerpos en cigarro) observándose en abundancia; lo que hace suponer que las técnicas de coloración convencionales para cortes histológicos no tienen la totalidad de los elementos fúngicos, por lo que estos aparecen muy escasos.

Por otra parte de acuerdo a la hipótesis de F. Marlat (información personal 1978) de que existen micropartículas fúngicas con carga genética, menores de $0.2\mu\text{m}$ en los tejidos afectados que sean en buena parte las responsables del crecimiento de colonias de S.schenckii, en casi la totalidad de los casos de esporotricosis, parece haberse comprobado al menos parcialmente en este estudio ya que se observaron estas pequeñas

partículas con una fluorescencia específica. Desde luego es importante continuar estos estudios diseñando técnicas para aislar estas partículas y proceder a su identificación bioquímica para conocer su naturaleza y a que parte de la célula del hongo corresponden.

Aunque no se conocen en la totalidad los mecanismos de patogenicidad de S. schenckii, se considera que la capacidad de adaptación a la temperatura corporal es indispensable para el establecimiento del hongo en el hospedero (Bulmer y Frontling 1983), altas temperaturas pueden inhibir la multiplicación o el metabolismo del hongo, favoreciendo la acción de los mecanismos de defensa natural del hospedero; un incremento moderado en la temperatura corporal puede mejorar o estimular los mecanismos de protección tanto inespecíficos como específicos. Como resultado de la interacción directa entre el microorganismo y el hospedero puede presentarse la enfermedad; para lo cual el hongo debe: a) penetrar al hospedero b) multiplicarse en los tejidos c) evadir los mecanismos de defensa del hospedero y d) capacidad para causar daño (Bulmer 1983).

En general los hongos no son fácilmente eliminados de los tejidos por células fagocíticas, debido por una parte al tamaño del hongo, por otra parte las peptidoglicanos, galactomananos, sialoglicolípidos y amilasa que constituyen la pared celular de las fases levaduriforme y micelial de S. schenckii (Travassos 1985) disminuyen la fagocitosis, como lo indican Oda y cols en 1983 quienes observaron que las ramnomananas disminuyen el poder de fagocitosis.

Los leucocitos polimorfonucleares (pmnl) juegan un papel significativo en la resistencia contra S. schenckii. Una vez que el microorganismo penetra al tejido es capaz de estimular macrófagos locales, posteriormente llegan los pmnl a los tejidos para fagocitar al hongo (Murphy 1991). Cuando los macrófagos presentan alguna alteración en su actividad fagocítica el hongo sobrevive dentro de ellos por largo tiempo, lo cual probablemente favorece la transformación de las estructuras parasitarias clásicas.

Oda y cols en 1983 sugieren la presencia de receptores en macrófagos peritoneales, los cuales se enlazan a componentes superficiales del hongo y favorecen la fagocitosis. Por otra parte Cunningham y cols. indican que el mecanismo por el cual los pmnl y los monocitos matan a las levaduras, es la combinación H_2O_2 , haluro y mieloperoxidasa que son tóxicos para el hongo. El KI empleado como tratamiento en la esporotricosis actúa estimulando la fagocitosis de los pmnl y finalmente la activación de la mieloperoxidasa.

Hiruma y col. 1988 mediante microscopía electrónica observaron que los pmnl y los macrófagos fagocitan levaduras, las cuales no son destruidas reproduciéndose dentro de

éstas células. En nuestro estudio la inmunofluorescencia indirecta demostro también que algunas levaduras son intracelulares.

Aún cuando los estudios sobre la posible intervención de células fagocíticas contra S. schenckii se ha realizado con levaduras, forma no infectante del hongo, éstos trabajos nos dan un indicio sobre el posible destino del hongo una vez que ha penetrado al hospedero. En este estudio se usó la forma micelial del hongo para infectar cobayos, y mediante las técnicas de inmunofluorescencia se pudieron observar numerosas estructuras fúngicas, de diferentes formas y tamaño de tipo intracelular, principalmente. En pacientes con esporotricosis también fue posible observar las estructuras fúngicas intracelulares; estos hallazgos podrían indicarnos la interacción con las células fagocíticas. Un posible hábitat intracelular de S. schenckii también puede explicar la escasez o falta de visualización de los elementos fúngicos en cortes histológicos o exudados tomados directamente del paciente.

Otra explicación al mismo fenómeno sería el que las células fagocíticas puedan servir como un medio de transporte hacia diversos sitios del hospedero, para establecerse y llevar a cabo su transformación a formas parasitarias, multiplicación y el desarrollo de la esporotricosis .

Finalmente como sucede en la lepra donde Mycobacterium leprae puede perpetuar su estancia en el macrófago y condicionar la cronicidad del padecimiento, en la esporotricosis un fenómeno similar podría explicar la cronicidad en esta micosis.

CONCLUSIONES:

- 1.- El porcentaje de positividad a la IDR fue mayor en la población de Jicolapa, Zacatlán (15%) que en la de Progreso, Teziutlán (2.5%), existiendo un mayor predominio de positividad a la IDR en el sexo femenino.
- 2.- La mayor prevalencia de infección, a través de la IDR se presentó en las personas dedicadas al hogar y en segundo término en campesinos.
- 3.- El aislamiento de S. schenckii fue más frecuente a partir de los rosales y de la tierra de éstos, así como de cafetales.
- 4.- En testículos de cobayo se observaron muy tempranamente las estructuras parasitarias de S. schenckii (2 días), seguidas de hígado (3 días). En riñón estas aparecieron en forma tardía.
- 5.- Las siguientes estructuras parasitarias se observaron en una frecuencia decreciente: levaduras simples, levaduras gemantes, cuerpos en cigarro, levaduras con tubos germinales y micelio.
- 6.- El tiempo de conversión de la fase micelial a levaduriforme se presentó de los 3-6 días, al utilizar la vía IP y a los 2 días al utilizar la vía IT.
- 7.- Fue posible visualizar por histopatología e improntas elementos parasitarios del hongo en 6/10 muestras de los pacientes con esporotricosis.
- 8.- La inmunofluorescencia indirecta fue la mejor técnica para demostrar las formas parasitarias de S. schenckii ya que estas se observaron en el 100% de los pacientes tanto en las improntas como en los cortes histológicos.
- 9.- Mediante la inmunofluorescencia se puso de manifiesto, en la infección experimental la presencia de elementos puntiformes, presentándose en mayor cantidad en cortes histológicos que en improntas, tanto intra como extracelularmente.

RESUMEN.

En un periodo comprendido de agosto de 1988 a mayo de 1991 se realizó una encuesta epidemiológica en 2 poblaciones rurales pertenecientes a la zona norte del estado de Puebla; para lo cual se aplicaron 133 IDR con esporotricina levaduriforme en Jicolapa Zacatlán y 237 en Progreso Teziutlán, obteniendo para la primera población un 15% de positividad y un 2.5 % para la segunda. El mayor porcentaje de positividad a la IDR se presentó en el sexo femenino y en personas dedicadas al hogar y en campesinos. El aislamiento de S.schenckii en Jicolapa fue del 8.5% de los 47 suelos procesados y el 11.11% de las 53 plantas procesadas, en cambio en la población de Progreso solamente se aisló el 5.79% de 120 muestras de suelo y ningún aislamiento de las 41 muestras de plantas.

También se realizó un estudio histopatológico en órganos de cobayos infectados por vía intraperitoneal e intratesticular. En hígado, páncreas, bazo y riñón se demostraron estructuras parasitarias a los 6 días de inoculación. Al utilizar la vía intratesticular la recuperación por cultivo y observación de las formas parasitarias del hongo fué evidente a partir de los 2 días, además fue posible observar en este tiempo las formas de transición micelio levadura en improntas.

La aplicación de inmunofluorescencia en cortes e improntas de tejidos de los órganos de cobayos puso de manifiesto las estructuras parasitarias del hongo a los distintos tiempos de infección estudiados.

Finalmente los estudios realizados en pacientes con esporotricosis, demostraron que a través de la tinción de PAS en cortes histológicos se visualizó en 6 de 10 muestras de pacientes, algunas estructuras parasitarias del hongo. En cambio por inmunofluorescencia se observaron en las 10 muestras de los pacientes estudiados formas parasitarias de S.schenckii tales como: levaduras simples, gemantes y elementos puntiformes, de tipo intra y extracelular.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aceves,O.R.,Aguirre,C.R. & Sosto,P.F. 1961. Esporotricosis. Análisis de 70 casos estudiados en la ciudad de Guadalajara. Bol. Dermatol.Méx.,1(5)15-25.
- 2.- Baker,R.D. 1947. Experimental Sporotrichosis in ice.Am.J.Trop.Med.27:749-757.
- 3.- Benham,R.W. & Kesten, B.1932. Sporotrichosis.Its transmission to plants and animals.J.Infec.Dis.50:437-458.
- 4.- Bulmer,G.S. & Fromtling,R.A.1983. Pathogenic Mechanisms of Mycotic Agents. In: Fungi Pathogenic for Human and Animals.vol3. Howard,D.H. (Ed), Marcel Deckker, Nueva York.
- 5.- Calle,G.V. & Restrepo,A.M.1961. Esporotricosis Antioquia Médica.11(7)444-464.
- 6.- Conti-Díaz,I.A. 1981. La esporotricosis en el Uruguay. Aspectos epidemiológicos y clínicos.An.Fac.Med. Montevideo.4(2)137-246.
- 7.- Conti Díaz,I.A. & Civita,E. 1968. Exposure of mice to inhalation of pigmented conidia of Sporothrix schenckii.28(8)1-6.
- 8.- Conti Díaz I. 1989. Epidemiology of Sporotrichosis in Latin America. Mycopathologia.108 (2) 113 -118.
- 9.- Coiscou W.A.; Lizardo C. & García R.1978. Esporotricosis en la República Dominicana. Revista Dominicana de Dermatología.12: 29 - 34.
- 10.- Cox A.R. 1983. Cell Mediated Immunity. In : Fungi Pathogenic for Human and Animals. Howard D.H. (Ed), Marcel Deckker, Nueva York.
- 11.- Cunningham K.M. ; Bulmer G.S. & Rhoades E.R. 1979. Phagocytosis and Intracellular Fate of Sporothrix schenckii. Journal of infectious diseases. 140(5) 815 -817.
- 12.- Chaerovnit,Y. & Taylor,R.L. 1979. Experimental Sporotrichosis in Syrian Hamsters. Infection and Immunity.23(2)366-372.
- 13.- Dexter H. & Orr G,F. 1962. Comparison of strains of Sporothrix schenckii isolated from nature. J. Bacteriol. 85: 816 - 821.
- 14.- Feuerman, E.J., Alteras,I., Bashan,D. & Lehrer,N.B. 1976. Isolation of Sporothrix schenckii in the soil in Israel in relation to a new case in man. Sabouraudia. 14: 217 - 222.
- 15.- Findley,G.H. & Vismer,H.F. 1986. Studies in Sporotrichosis fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments. Mycopathologia. 96:115-122.

- 16.- Geldres,J., Miranda,H., García, J. & Tincipa,L. 1973. Esporotricosis. Determinación de un Area endémica en el norte del Perú (Otuzco La Libertad). 51 (1) 33 - 51.
- 17.- González,O.A. 1965.Contribuciones recientes al conocimiento de la sporotricosis. Gaceta Médica de México.15(2)463-474.
- 18.- González,O.A.1969. Las micosis pulmonares en México y Centro América. Aspectos Epidemiológicos.Rev.Invest.Salud Pública.México.29(3)179-196.
- 19.- González,O.A. 1975.Geografía de las micosis profundas.Rev.Inv.Salud Pública, México.35:85-96.
- 20.- González,O.A.,Félix,D. & Anaya M.1967.Inmunofluorescence in Sporotrichosis. Dermat.lb.Lat.Am.2:77-82.
- 21.- González,O.A. & Soto,F.1947.Polisacáridos del Sporotrichum schenckii. Datos Inmunológicos. Intraderno-reacción en el diagnóstico de la sporotricosis. 8(2)143-153.
- 22.- González,O.A. & Soto,P.1950.Desarrollo del Sporotrichum schenckii en el pus obtenido de gomas esporotricósicas. Algunos datos sobre su ciclo evolutivo. Rev.Inst.Salubr.Enferm.Trop.México.8(1)3-19.
- 23.- González,O.A.,Ricoy,E.,Velasco,O.,López,R & Navarrete,F. 1970.Valoraclón comparativa de los antígenos polisacárido y celular de Sporothrix schenckii. Rev.Inv.Salud Pública.México.30(4)303-313.
- 24.- Harada T., Nishikawa T. & Hatano H. 1976. Antigenic Similarity between Ceratomyces species and Sporothrix schenckii as observed by immunofluorescence. 14: 211 - 215.
- 25.- Hektoen,L.& Perkins,F.1900. Refractory subcutaneous abscesses caused by Sporothrix schenckii. A new pathogenic fungus.J.Exp.Med.5:77-89.
- 26.- Hiruma,M. & Kagawa,S.1986.A case of Sporotrichosis with numerous fungal elements phagocytized by polymorphonuclear leukocytes.Mykosen.29(2)59-63.
- 27.- Hiruma,M., Kawada A. & Isibashi A. 1991. Ultraestructure of Asteroid Bodies in Sporotrichosis. Mycoses. 34: 103 - 107.
- 28.- Ingrish,F.M. & Schneldau,J.D. 1967. Cutaneous hypersensitivity to sporotrichin in Maricopa country, Arizona.J.Invest.Dermatol.49(2)146-149.
- 29.- Kaplan,W. & González,O.A.1963.Application of the fluorescent antibody technique to the rapid diagnosis of sporotrichosis.J.Lab. & Clin.Med.62(5)835-841.

- 30.- Kaplan,W. & Ivens,S.1960.Fluorescent antibody staining of Sporotrichum schenckii in cultures and clinical materials.J.Invest.Dermatol.35:151-159.
- 31.- Kinbara,T. & Fukushima,R.1982. Fungal elements in tissues of Sporotrichosis. Mykosen.26(1)35-41.
- 32.- Lavalle, P. 1959. Esporotricosis en México. Algunas Peculiaridades clínicas y Síntesis Patogénica. Memorias III Congreso Ibero-latino Americano de Dermatología. México. pp. 190 - 197.
- 33.- Lavalle,P.1978. Aspectos clínicos, inmunológicos y epidemiológicos de la esporotricosis. Memorias IV Cong.Méx.Dermatología.Tamps.México.5-18.
- 34.- Lavalle,P. 1972. La Sporotrichose. Encyclopédie Médico- Chirurgicale. Paris. 8124 A. 1 - 6.
- 35.- Lavalle P. 1975. Epidemiología del Micetoma y de la Esporotricosis con especial referencia al estado de Puebla. Memorias del VI Congreso Mexicano de Dermatología. pp. 270 - 275.
- 36.- Lavalle,P.1979.Esporotricosis.Simposio Syntex:Desarrollo y estado actual de la Micología en México. Ediciones del Instituto Syntex,México.115-138.
- 37.- Lavalle,P. & Marlat,F.1983.Sporotrichosis.Bulletin de L'Institut Pasteur. 81:295-322.
- 38.- Lavalle,P. & Marlat,F. Sporotrichosis. 1983. Bulletin De L' Institut Pasteur. 81: 295 - 322.
- 39.- Lavalle,P., Novalés,J. & Marlat,F. 1963. Esporotricosis. Nuevas observaciones clínicas, histopatológicas y micológicas. Memorias del I Congreso Mexicano de Dermatología. México. pp. 276 - 287.
- 40.- Lurie,H.I. & Still,J.1969. The "capsule" of Sporotrichum schenckii and the evolution of the asteroid body a light and electron microscopic study.Sabouraudia.7:64-70.
- 41.- Maberry,J.D.,Mullins,J.F.&Orville,J.S.1966.Sporotrichosis with demonstration of hyphae in Human Tissue.Arch.Dermat.93:65-67.
- 42.- Marlat, F. 1975. Observations sur L' ecologie de Sporotrix schenckii et de Ceratocystis stenoceras en Corse et en Alsace, provinces françaises indemmes de Sporotrichose. Sabouraudia. 13: 217 - 225.
- 43.- Marlat, F. & Lavalle,P. 1991. Sporotrichosis. Human Mycosis in Tropical Countries. 2a. edition. U.S.A. 107 - 118.
- 44.- Marlat,F., Lavalle,P. & Destombes,P. Recherches sur la Sporotrichose. Etude Mycologique et Pouvoir Pathogene de souches Mexicaines de Sporotrichum schenckii. Sabouraudia. 2(2): 60 - 79.

- 45.- Mayorga,R., Cáceres,A.,Torlrello,C.Gullérrez,G.,Alvarez,O.,Ramírez,M. & Mariat, F. 1979. Investigación de una zona endémica de esporotricosis en la región de la laguna de Ayarza,Guatemala.Bol.Of.Sanit.Panam.87(1)20-32.
- 46.- Mackinnon,J.E.,Conti,D.I.,Gezuele,E.,Civita,E.,& Da Luz.,S. 1969. Isolation of Sporothrix schenckii from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. Sabouradla.7:38-45.
- 47.- Moore,M.1946.Radlate formation on pathogenic fungi in human tissue. Archives of pathology.42(2)113-153.
- 48.- Moore,M. & Ackerman,L.1946.Sporotrichosis with radlate formation in Tissue. Arch.Dermat. & Syph. 53:253-264.
- 49.- Mohri,S., Nakajima,H.,Kurosawa,T.,Takanashi,Y. & Nagai,R. 1987. Three cases of Sporotrichosis with Numerous Fungal Elements. Journal of Dermatology. 14: 382 - 387.
- 50.- Murphy,J.W. 1991. Mechanisms of Natral Resistance to Human Pathogenic Fungi. Annu.Rev. Microbiol 45: 509 - 538.
- 51.- Novalles, J. & Levalle,P. Esporotricosis. 1970.Algunos Aspectos Histopatológicos. Memorias del V Congreso Mexicano de Dermatología. pp. 270 - 275.
- 52.- Nielsen,H.S.1968.Biologic properties of skin test antigens of yeats from Sporotrichum schenckii.J.Infec.Diss. 118(2)173-180.
- 53.- Oda,L.M., Kubelka,C.F., Alviano,C.S. & Travassos,L.R. 1983. Ingestion of yeast forms of Sporothrix schenckii by mouse peritoneal macrophages. Infection and Immunity. 39(2) 497 - 504.
- 54.- Padilha G.A.1973. Geopathology of Sporotrichosis. Int. J. Dermatol. 12(2)115-118.
- 55.- Plinkus,H. & Grekin,J.N.Sporotrichosis with asterold tissue forms. 1950. Arch. Dermat.Syph.61:813-819.
- 56.- Rippon,J.W.1988. Medical Mycology,W.B. Saunders Company. Philadelphia. 325-352.
- 57.- Rocha,P.H.1968.Prueba cutánea con esporotricina.Mycopatología.36:42-54.
- 58.- Rodríguez,T.G.1985.El cuerpo asterolde de la esporotricosis. Especificidad y diferenciación de otras formas asteroldes. Biomédica.5(1,2):11-20.
- 59.- Rodríguez,T.G. & Palencia,Y.1985.Esporotricosis.Valor diagnóstico del cuerpo asterolde.Biomédica.5(1,2)41-46.

- 60.- Schneidau, J.D., Lamar, L.M. & Hairston, M.A. 1964. Cutaneous Hypersensitivity to Sporotrichin in Louisiana. *Jama*. 188(4)121-123.
- 61.- Steele, R., Cannady, P.B., Moore, W.L. & Gentry, L.O. Skin Test and Blastogenic Responses to Sporotrichum schenckii. *J. Invest. Clin.* 57:156-160.
- 62.- Szanizlo, J.P. 1985. Fungal Dimorphism with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans. Plenum Press. U.S.A.
- 63.- Toriello, C. & Mariat, F. 1974. Etude Comparée des polyosides des champignons Ceratocystis stenoceres et Sporothrix schenckii. Composition chimique et analyse immunologique. *Ann. Microbiol.* 125 A: 287 - 307.
- 64.- Travassos, L.R. & Lloyd, K.O. 1980. Sporothrix schenckii and Related Species of Ceratocystes. *Microbiol. Rev.* 44(4)683-721.
- 65.- Velasco, N. 1980. Esporotricosis. *Actas de la Fac. Med. U.A.G. México*. 1(2)92-98.
- 66.- Velasco, O. & González, O.A. 1971. Esporotricosis en individuos con esporotricino reacción positiva previa. *Rev. Inv. Salud Pública, México*. 31(1)53-55.
- 67.- Velasco, C.O. & González, O.A. 1976. La esporotricosis en un pequeño poblado de la sierra de Puebla. *Rev. Inv. Salud Pública, México*. 36:133-137.
- 68.- Velázquez, J.P., Restrepo, A. & Calle, G. 1976. Experiencia de 12 años con la esporotricosis polimorfismo clínico de la entidad. *Antioquia Médica*. 26(2)153-167.
- 69.- Ventin, M., Ramírez, C., Ribera, M., Ferradiz, C., Savall, R & Peyri, J. 1987. A significant geographical area for the Study of the epidemiological and ecological aspect of Mediterranean Sporotrichosis. *Mycopathologia*. 99 (1) 41 - 44.
- 70.- Uribe, F., Zuluaga, A. & Restrepo, A. 1985. Aspectos histológicos de la esporotricosis y búsqueda del agente etiológico por métodos inmuno-enzimáticos. *Acta Med. Col.* 10(2)65-74.