

83
CEJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

OBTENCION DE EXOANTIGENOS PARA LA DETERMINACION DE RELACIONES INMUNOLOGICAS ENTRE DIVERSOS AGENTES DE LA CROMOBLASTOMICOSIS.



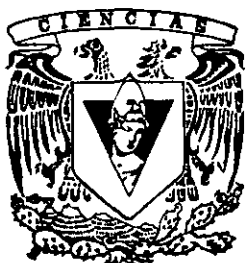
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

HORTENSIA NAVARRO BARRANCO



ASESOR: DRA. TERESA MIER

MEXICO, D. F.

274170

1999.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

A mis padres

Sr. Hugo Navarro Bolandi †

Sra. Esperanza Barranco Mendoza.

Con todo mi amor, respeto y agradecimiento por todo el apoyo que siempre me brindaron.

Con toda mi amor a

Jorge

Por todo lo que hemos compartido y logrado, por tu cariño, comprensión y apoyo en todo momento. Gracias.

A mis hijos

Jorge

Roberto

Arturo

Por ser mi más valioso tesoro y con el ferviente anhelo de que se mantengan unidos y de que día a día se esfuercen en ser mejores.

Con cariño a mis nietos.

Jorge Iván, Jorge Alejandro y Sergio Alberto.

CON CARÍÑO Y ADMIRACIÓN

A LA DRA. TERESA MIER GONZÁLEZ. INVESTIGADOR Y PROFESOR DE TIEMPO COMPLETO DEL DEPTO. EL HOMBRE Y SU AMBIENTE, UAM. POR SUS CONSEJOS, ASESORÍA Y CONFIANZA DEPOSITADA DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA, JEFE DEL LABORATORIO DE MICOLOGÍA BÁSICA, FACULTAD DE MEDICINA UNAM, POR EL CONSTANTE APOYO QUE SIEMPRE ME HA BRINDADO, POR SU PACIENCIA Y ENSEÑANZAS.

A la QFB. Amelia Pérez Mejía por contar siempre con su amistad y ayuda incondicional.

Al Biól. Mohamed Alí Pereyra Morales y al Biól. Miguel Angel Ayala Zermeno por su amistad, paciencia y valiosa ayuda en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Rocío Reyes Montes, QFB Aurora Hernández, Biól. Esperanza Duarte, QBP. Gabriela Rodríguez, QBP Eugenia Flores, M en C. Gabina Arenas por la ayuda que siempre me han brindado y por su amistad.

A todas aquellas personas de quienes recibí muestras constantes de apoyo, estímulo y confianza. Gracias.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA BÁSICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM. BAJO LA ASESORÍA DE LA DRA. TERESA MIER GONZÁLEZ.

CONTENIDO

RESUMEN -----	1
INTRODUCCION -----	2
JUSTIFICACIÓN -----	11
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA E HIPÓTESIS -----	12
OBJETIVOS -----	13
MATERIAL Y MÉTODOS -----	14
CEPAS-----	14
MEDIOS DE CULTIVO-----	14
CURVA DE CRECIMIENTO-----	15
OBTENCION DE EXOANTÍGENOS-----	15
INMUNIZACIÓN Y OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES-----	16
PRUEBAS DE INMUNODIFUSIÓN-----	16
RESULTADOS -----	18
DISCUSIÓN -----	20
CONCLUSIONES -----	23
BIBLIOGRAFÍA -----	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Conidiación	29
Fig. 2 Colonia de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	30
Fig. 3 Colonia de <i>Fonsecaea compacta</i>	30
Fig. 4 Colonia de <i>Phialophora verrucosa</i>	31
Fig. 5 Colonia de <i>Cladosporium carrionii</i>	31
Fig. 6 Colonia de <i>Wangiella dermatitidis</i>	32
Fig. 7 Arreglo de las capas de la pared celular en el ápice fértil de los filídes y anélicos	33
Fig. 8 Esquema General de Trabajo	34
Fig. 9 Esquema de Inmunización	35
Fig. 10 Obtención de Exoantígenos	36
Fig. 11 Crecimiento radial de los agentes causales de la cromoblastomycosis	37
Fig. 12 Inmunodifusión de suero hiperinmune de anti- <i>P. verrucosa</i>	38
Fig. 13 Inmunodifusión de suero hiperinmune de anti- <i>F. pedrosoi</i>	39
Fig. 14 Inmunodifusión de suero hiperinmune de anti- <i>C. carrionii</i>	40
Fig. 15 Inmunodifusión de suero hiperinmune de anti- <i>F. compacta</i>	41
Fig. 16 Inmunodifusión de suero hiperinmune de anti- <i>W. dermatitidis</i>	42

RESUMEN

Se obtuvieron exoantígenos de *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Cladosporium carrionii* y *Wangiella dermatitidis* a partir de filtrados de cultivos, para observar sus posibles relaciones inmunológicas por la técnica de inmunodifusión en geles de agarosa en presencia de sueros hiperinmunes de conejo. Este procedimiento permitió la separación inmunológica de *Wangiella dermatitidis* de los agentes de la cromoblastomycosis. Se encontraron reacciones cruzadas entre los antisueros de *P. verrucosa*, *F. pedrosoi*, *F. compacta* y *C. carrionii* y los exoantígenos obtenidos a partir de estos hongos. A pesar de las reacciones cruzadas observadas los resultados establecen el valor potencial de la prueba de los exoantígenos para realizar la diferenciación taxonómica presuntiva de las especies estudiadas.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Los hongos son organismos cuyo nivel de organización está dado por las fases levaduriformes y miceliales o filamentosos. Estas fases pueden alternarse en respuesta a estímulos externos y dar lugar al fenómeno conocido como dimorfismo. Por lo común son filamentosos, el cuerpo vegetativo o soma recibe el nombre de talo cuyos filamentos individuales se denominan hifas, estas crecen solo en sus extremos por lo que los hongos presentan crecimiento apical y se ramifican dando como resultado una red de hifas, la cual se denomina micelio. Las paredes celulares están constituidas principalmente por quitina en combinación con diversos polisacáridos, aunque puede estar ausente en algunos grupos taxonómicos. Los hongos son eucariontes, con núcleo y membrana nuclear, son heterótrofos pues requieren de materia orgánica para desarrollarse, debido a que carecen de clorofila y por tanto de la capacidad para efectuar fotosíntesis. El tipo de nutrición es por absorción, viven como saprobios o parasitando vegetales y animales diversos. Los hongos han tenido una gran influencia en la vida del hombre, el uso más antiguo de los hongos es sin duda su empleo como alimento ya que muchos son comestibles como es el caso del champiñón *Agaricus brunnescens* (*A. bisporus*) que es cultivado en varios países del mundo. La mayor utilidad práctica al hombre es en diversos procesos industriales para la obtención de muchos productos incluyendo bebidas alcohólicas, alimentos y fármacos importantes. Desde épocas muy remotas las levaduras se han empleado en la elaboración de pan, vino y cerveza. La maduración y fermentación de ciertos quesos muy apreciados como el tipo roquefort, camembert y otros depende en gran parte de la actividad metabólica de ciertos mohos. De varias especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* se han obtenido diversos antibióticos. Otra propiedad útil es su empleo en la lucha ecológica de plagas pues algunos hongos parasitan los insectos y los destruyen y el hombre aprovecha esta propiedad para combatir estos agentes nocivos que causan grandes pérdidas económicas en la agricultura. La capacidad que tienen muchos mohos de vivir a temperaturas relativamente bajas les permite desarrollarse en numerosos productos alimenticios como granos, frutas y otros alimentos básicos que son almacenados y contaminarlos con micotoxinas que afectan

la salud. Los hongos presentan también otras acciones nocivas como son la destrucción de materiales muy diversos como la madera de las construcciones, los libros en las bibliotecas así como los durmientes de los ferrocarriles. Sin embargo los hongos macroscópicos venenosos pueden envenenar o matar a las personas que no los saben distinguir de las especies comestibles, entre las especies más venenosas podemos citar a *Amanita faloides*, *A. verna* y *A. vilosa*. También de gran importancia médica son los hongos parásitos de animales incluyendo al hombre debido a que ocasionan diversos padecimientos leves o severos al causar micosis que constituyen un problema de salud (Deacon, 1988; Herrera,1990)

La cromoblastomicosis es una infección crónica que afecta a la piel y al tejido subcutáneo, es causada por varios hongos dematiáceos los cuales se encuentran distribuidos en zonas tropicales y subtropicales de varios países del mundo. En América principalmente en Brasil, Venezuela, Colombia, Centroamérica, Cuba, República Dominicana y Puerto Rico En México la mayoría de los casos proceden de los estados de Jalisco, Oaxaca, Veracruz, Puebla y Yucatán, la zona endémica de mayor importancia es la Huasteca, región que incluye muchos valles y ríos con temperatura promedio anual de 20-25 °C, también la incidencia de esta enfermedad es relativamente elevada en la población rural (Bonifaz,1990; Arenas,1994).

Los principales agentes etiológicos de la cromoblastomicosis son *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta* y *Cladosporium carrionii*. Durante algún tiempo se consideró a *Wangiella dermatitidis*, otro hongo dematiáceo, como agente de la cromoblastomicosis. Sin embargo, en 1974 se creó un nuevo término: feohifomicosis para agrupar a estos hongos cuya forma parasitaria presenta un micelio dematiáceo septado que pueden presentar micosis subcutáneas o sistémicas (Ajello,1986)

Aunque la enfermedad se presenta con más frecuencia en las regiones tropicales, el primer caso reportado ocurrió en Boston en 1915 y fue descrito por Lane y Meddlar, en un paciente originario de Nueva Inglaterra que presentaba lesiones verrucosas en un pie El hongo aislado fue identificado con el nombre de *Phialophora verrucosa* (Medlar, 1915) Sin embargo, autores brasileños entre los que destacan Pedroso y Gomes, habían

observado el padecimiento e identificado el agente etiológico desde 1911. Sus estudios revelaron que si bien el agente etiológico era un hongo dematiáceo, sus características de esporulación eran diferentes de las del hongo estudiado por Medlar y lo denominó *Hormodendrum (Fonsecaea) pedrosoi* (Brumpt) Negroni 1936. Posteriormente en 1940 Carrión observó una variante del agente distinto de *F. pedrosoi* y lo denominó *Fonsecaea compacta*. (Arenas, 1993; Rippon, 1990). Simpson describió un organismo distinto aislado de casos en Sudáfrica y Australia, Trejos nombró a este hongo como *Cladosporium carrionii* (Trejos, 1954). La identificación por Trejos (1954), de que por lo menos un hongo del género *Cladosporium* podía ser también agente causal complicó mucho la nomenclatura de los agentes etiológicos de la cromoblastomycosis (Rippon,1990).

Esta micosis se origina por traumatismo a través del cual se introducen las hifas y conidios dentro de la piel, generalmente se limitan, la mayor parte de las veces al tejido celular subcutáneo. La enfermedad puede progresar lentamente por lo que el traumatismo puede haberse producido mucho tiempo antes de que la lesión aparezca, se forman células escleróticas dentro de la dermis como forma de resistencia del hongo que perduran en el tejido. Al principio la lesión es pequeña, elevada, eritemato-costrosa, verrucosa; hasta que se torna ulcerada es reemplazada paulatinamente por lesiones verrucosas, secas, costrosas, crónicas y de bordes elevados, que pueden extenderse de 1 a 3 cms por arriba de la superficie de la piel normal (Cooper,1985). Su diseminación a tejidos contiguos puede tomar años; cuando han durado mucho tiempo pueden tornarse pedunculadas y tener la apariencia de un tumor parecido a una coliflor. La lesión es indolora y en las etapas iniciales no produce molestias importantes, lo que hace que los pacientes no se preocupen por atenderse. El trauma repetido puede hacer que la lesión se ulcere y produzca una infección secundaria con bacterias piógenas, con lo cual la lesión adquiere un olor fétido. A medida que la infección progresa hay fibrosis, lo que puede causar obstrucción en la circulación linfática produciéndose elefantiasis de la extremidad afectada. No hay invasión a huesos o músculo y son muy raros los casos en los que hay diseminación hematogena hacia otras zonas del cuerpo (Rippon, 1990).

Estos hongos se hallan como saprobios entre la vegetación y hojarasca del suelo, razón por la cual afectan preferentemente a la población rural, mayormente expuesta a sufrir algún traumatismo en la piel de pies y piernas. Estos son los sitios más afectados, aunque se pueden encontrar en cualquier otra parte del cuerpo susceptible en contacto con el hongo. La enfermedad es más frecuente en hombres de 30 a 50 años que en mujeres y niños ya que los primeros laboran en el campo y carecen de la protección de zapatos (Arellano *et al*, 1968; Bennet y Kwong-Chung, 1992; Tay, 1994).

Todos estos hongos son dimórficos y tienen la característica de presentar una fase parasitaria idéntica a pesar de estar situados en diferente posición taxonómica a nivel de género, dado que no se conoce su fase sexual la caracterización se da por sus características morfológicas de la fase asexual. El diagnóstico de laboratorio de la cromoblastomicosis se realiza a través del examen directo, y se confirma mediante cultivo en Sabouraud (S) y Sabouraud micobiótico (S M). La toma de muestras se hace recolectando las escamas por raspado de dos portaobjetos o con un bisturí y caja de Petri, debido a que las escamas son muy gruesas, se deben de colocar entre porta y cubreobjetos con KOH al 40% ó bien KOH al 20%, pero dejándolas reposar 30 minutos. La forma parasitaria conocida como células fumagoides o Esclerotes de Meddlar son células de aproximadamente 6-12 μm de diámetro, de color marrón, paredes gruesas que se encuentran solas o agrupadas formando racimos de 4 a 8 célula, dándole el aspecto de granos de café. Cuando las escamas provienen de placas muy hiperqueratósicas y son tomadas de las partes más superiores, es posible observar además filamentos gruesos, tabicados y oscuros que nacen de acúmulos de células fumagoides. En la secreción de los quistes se pueden encontrar hifas, muy deformadas (de 3 a 8 μm de ancho) y cuerpos pleomórficos de color pardusco (hasta de 20 μm de diámetro). Histológicamente se les puede observar dentro de leucocitos o células gigantes así como libremente en el tejido. Ocasionalmente puede desarrollarse un micelio en las costras superficiales de la lesión (Lara, 1979; Bonifaz, 1990; Tay, 1994).

El cultivo de estas células confirma el diagnóstico de la cromoblastomicosis, presentando características similares, pues desarrollan colonias de crecimiento lento con pigmentación verde olivo a pardo negruzco, frecuentemente forman pliegues y se hallan cubiertas con

un micelio aéreo corto y aterciopelado, ligeramente sumergido en el sustrato y con el reverso negro (Bonifaz, 1990; Herrera, 1990; Arenas, 1994).

A simple vista no es posible diferenciar a las especies que causan esta micosis y como la etapa sexual de estos hongos no se conoce, se utiliza su fase asexual para poder identificarlos. Presentan tres tipos de conidiación: El tipo *Phialophora* (Fig.1) donde hay una célula conidiógena característica llamada fiálide, que se encuentra terminalmente o a lo largo del micelio esta estructura tiene forma de botella con base redondeada, oval o alargada y cuello estrecho. Los conidios se forman en el extremo de la fiálide y son expulsados a través del cuello. Se pueden acumular alrededor del área del cuello dándole un aspecto de “florero”. El tipo *Cladosporium* (Fig.1) presenta conidióforos con cadenas de conidios en el extremo, que a su vez, forman conidios secundarios, la conidiación continúa con formación de largas cadenas en donde el conidio terminal es el más joven y ha gemado a partir del anterior. Por último se observa el tipo *Rhinoctadiella* (Acroteca) (Fig.1) que forma conidióforos nodulosos sobre los cuales nacen hileras de conidios ovales y elongados los cuales son producidos en forma irregular en el extremo y a lo largo del conidióforo y pueden hallarse lateralmente sobre las hifas o bien pueden brotar como protuberancias a lo largo, dándole un aspecto de clava. Los conidios desprendidos muestran un engrosamiento o cicatriz que se llama disyuntor, el cuál se encuentra conectado al siguiente conidio en la cadena. (Herrera, 1990; Rippon, 1990).

Fonsecaea pedrosoi es el agente etiológico más común de la cromoblastomicosis en México, Brasil y Madagascar. Se desarrolla en un tiempo promedio de 3 a 4 semanas presentando colonias pardas o negras de textura aterciopelada a vellosa, limitadas en ocasiones con surcos, al reverso se observa un pigmento negro ocre (Fig.2). Al examen directo se observan numerosas hifas pigmentadas, gruesas y septadas de 4 a 5 μm de ancho, presenta los tres tipos de conidiación aunque puede predominar el tipo *Cladosporium* luego las fiálides y acrotecas (Rippon, 1990).

Fonsecaea compacta es una especie menos frecuente que también exhibe los tres tipos de esporulación al igual que *F. pedrosoi* aunque su crecimiento es más lento y produce colonias plegadas de color negro olivo (Fig.3), desarrolla una pelusa que al paso del

tiempo contiene la mayor parte de los conidios, ocasionalmente produce fiálides (Rippon, 1990).

Phialophora verrucosa se desarrolla lentamente y entre 3 a 4 semanas presenta colonias con abundante micelio, limitadas, de color oscuro o negro, vellosas, aterciopeladas y en ocasiones se cubre con un ligero velo de color blanco; al reverso se observa un pigmento negro (Fig.4). Sólo se ha observado un tipo de conidiación que es el de *Phialophora*, cuando las colonias se hacen viejas es posible encontrar clamidosporas y cleistotecios (Bonifaz, 1990).

Cladosporium carrionii es el segundo agente causal más común, es una especie frecuente en zonas áridas y semiáridas de Venezuela y además se ha observado en Australia, Madagascar y Sudáfrica (Arenas, 1994). Se desarrolla lentamente y entre 2 a 3 semanas, presenta colonias planas radiadas de color verde oscuro a grisáceo, vellosas y aterciopeladas; al reverso presenta pigmento negro difusible (Fig. 5). Se observa abundante micelio, septado y pigmentado. Tiene un sólo tipo de conidiación, el característico tipo *Cladosporium* largo compuesto por cadenas de más de cuatro conidios que miden de 9 a 10 μm . Honbo *et al* (1984) demostraron que algunos aislamientos fueron capaces de formar fiálides.

Wangiella dermatitidis anteriormente llamada *Phialophora dermatitidis* (Rippon, 1990), es una especie común en Sudamérica. Las colonias, de 1 a 2 semanas de crecimiento son de tipo levaduriforme, negras, cremosas, ligeramente acuminadas y después de 3 a 4 semanas se presentan como colonias vellosas, aterciopeladas y negras; al reverso se observa un pigmento negro difusible (Fig.6). Al microscopio presenta numerosas células levaduriformes de forma oval a elíptica 3 a 4 μm de diámetro, cuando estas células son jóvenes son hialinas y de pared delgada pero conforme maduran son pigmentadas y de pared gruesa. A partir de estas células levaduriformes emerge un micelio septado y oscuro, del que surgen fiálides muy similares a las de *P. verrucosa*, algunos autores las describen como anélidos (Fig. 7) en algunas cepas se observa el tipo *Cladosporium* corto (Ajello, 1977; McGinnis, 1980; Cole, 1986; Bonifaz, 1990).

Debido a la variedad de tipos de esporulación que presentan estos hongos, resulta complicado poder identificarlos.

La terapia de esta enfermedad continúa siendo un problema pues no se cuenta con un tratamiento efectivo. En las primeras etapas de la enfermedad se puede intentar la extirpación quirúrgica, electrodesecación o la criocirugía, sin embargo la mayoría de los casos no son detectados tempranamente.

El empleo del calciferol ó vitamina D en ocasiones ha ayudado manejando una dosis de 600,000 UI por semana. El tiempo mínimo para evaluar este fármaco es de 2 meses. El yoduro de potasio también es administrado junto con el calciferol, la dosis empleada es de 3 a 6 gr/día. Uno de los medicamentos que ha dado mejores resultados es la 5-fluorocitosina, que se administra por vía oral a la dosis de 100-150 mg/K de peso. Desafortunadamente en México no se encuentra en el mercado además de que se requiere ingerir una gran cantidad de tabletas al día y al igual que otros medicamentos en los casos con lesiones muy extendidas no los cura por completo y deja varios islotes lo que permite que la enfermedad reincida. La terapia para el control de la cromoblastomicosis es independiente de la especie aislada. Otro fármaco que ha dado resultados es el itraconazol que resulta más efectivo contra especies como *C. carrionii*, no así para *F. pedrosoi*. La anfotericina B se ha utilizado por vía intravenosa, intraarterial e intralesional y en general ha dado buenos resultados, aunque puede causar efectos secundarios tales como daño renal y hepático, por lo prolongado del tratamiento y además al suspender la administración el proceso se reactiva (Bonifaz, 1990). En los últimos ocho años ha sido usado el itraconazol particularmente en casos asociados a *C. carrionii*. Se ha observado una mayor eficacia en combinación con fluorocitocina. Durante periodos prolongados el itraconazol ha mostrado un perfil seguro ya que en una serie de 41 pacientes no hubo efectos secundarios ni reacciones adversas, razón por la cual el itraconazol está siendo más utilizado que los medicamentos anteriores. Estudios recientes han probado la eficacia del uso de terbifina en el tratamiento de la cromoblastomicosis (Esterre, 1996).

Los campesinos constituyen el grupo más afectado, también se recomienda como medida preventiva el uso de calzado cerrado para evitar los traumatismos que propician la inoculación del hongo.

La posición taxonómica de estos organismos ha sido de gran controversia pues tradicionalmente se les consideraba dentro del grupo Deuteromycotina debido a que en este grupo representa hongos que no presentan etapa sexual (Deacon, 1988) La clasificación taxonómica de estos hongos basada en Ainsworth, 1973 y Hanlin & Ulloa, 1988 es la siguiente:

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Moniliales
Familia	Dematiaceae

Actualmente se les ha ubicado dentro del phylum Ascomycota, asexuales, por no conocerse su estado perfecto o sexual (Alexopoulos, 1996). Esta clasificación se ha basado en la comparación de las secuencias de DNA ribosomal que presentan estos hongos (Taylor, 1995). La identificación de los agentes causales de la cromoblastomycosis se ha basado tradicionalmente en el estudio morfológico de sus formas de esporulación y en especial en lo concerniente al ordenamiento y disposición de los conidios. Sin embargo, la extensa variedad de estas estructuras, el marcado pleomorfismo de especies como *F. pedrosoi* (Ibrahim-Granet y de Bièvre, 1984; McGinnis, 1980), las similitudes en la morfología de muchas especies pertenecientes a un mismo género, la dificultad en demostrar en algunos casos los conidios e incluso, la existencia de cepas no esporuladas, han motivado que la taxonomía de este grupo de hongos dematiáceos resulte generalmente confusa.

Standard y Kaufman (1976) y Kaufman y Standard (1978) han demostrado que usando la prueba de los exoantígenos es posible distinguir a *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* y *Paracoccidioides brasiliensis*, así como a miembros del género *Histoplasma* de otros hongos. Nicolaisen y Swatek (1980), obtuvieron antígenos específicos a partir de filtrados de cultivo de *W. dermatitidis* y *F. pedrosoi* que revelaban reacciones de precipitación solamente a los antisueros correspondientes y, no obtuvieron bandas específicas para *F. compacta* ni *P. verrucosa*. Honbo *et al.* 1984 hallaron

identidad inmunológica entre *C. ajelloi* y *C. carrionii* y observaron que *C. Trichoides* y *Xylohypha bantiana* comparten entre si componentes antigénicos. Recientemente se ha utilizado este método para la inmunoidentificación de algunas especies de *Penicillium* así como para algunos grupos de hongos oportunistas de importancia médica como es el caso de aislamientos de *Aspergillus* (Sekhon y Padhye, 1991; Kaufman, 1983).

La reacción de la precipitina es un método analítico útil para la identificación de anticuerpos o antígenos desconocidos. Si se permite que dos antígenos diferentes difundan cada uno en agar desde pozos vecinos hacia su anticuerpo específico u homólogo (Anti A ó Anti-B) se obtendrán líneas de precipitación. Con esta técnica es posible determinar si dos antígenos son idénticos, similares ó diferentes; al yuxtaponerse las reacciones en pozos vecinos. (Bellanti, 1980).

En este trabajo se propone utilizar exoantígenos obtenidos a partir de cultivos de *P. verrucosa*, *F. pedrosoi*, *F. compacta*, *C. carrionii* y *W. dermatitidis* y los sueros hiperinmunes correspondientes en conejo con el propósito de lograr la separación inmunológica de estas especies.

JUSTIFICACION

La identificación de hongos patógenos del hombre y animales se basa principalmente en su morfología. Uno de los aspectos a abordar de la micología médica está dado por la gran variabilidad morfológica de los hongos patógenos. La variabilidad depende no sólo de las propiedades genéticas de las diferentes especies o cepas sino también del medio en el cual se cultivan los hongos. Las condiciones encontradas por el hongo en el suelo, o por analogía, en los medios de cultivo donde se desarrolla en estado saprobio, son diferentes de aquellas que encuentra en el hospedero, donde actúa como parásito.

Los hongos que causan la cromoblastomycosis han sido clasificados en cuatro géneros, pero a pesar de que existe esta diversidad taxonómica, todos ellos desarrollan una misma entidad clínica e histopatológica, la cual es indistinguible entre los diferentes agentes causales.

La identificación de estos hongos se ha determinado principalmente, mediante el aislamiento del patógeno y la observación de las características morfológicas de los cultivos. Sin embargo, la ubicación taxonómica tradicional de los mencionados agentes no ha sido fácil de llevar a cabo debido a su complejidad morfológica y a la vez, a la creciente falta de taxónomos especializados. Por tal razón consideramos de gran interés el conocer las diferencias inmunológicas que pudieran existir entre ellos con el objeto de lograr identificar de un modo relativamente sencillo y fácil a los hongos de la cromoblastomycosis por medio de sus exoantígenos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La identificación específica de los agentes causales de la cromoblastomycosis resulta ser de gran complejidad pues tradicionalmente se ha basado en los tipos de esporulación que presentan y debido a que comparten una gran similitud en sus características morfológicas ha resultado difícil poder clasificarlos taxonómicamente.

El presente trabajo plantea establecer un método que permita diferenciar estos hongos a través de sus exoantígenos.

HIPOTESIS

Es factible establecer la diferenciación inmunológica presuntiva de los agentes etiológicos de la cromoblastomycosis mediante la aplicación del método de los exoantígenos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Valorar la prueba de los exoantígenos como un método inmunológico, sencillo, rápido y de bajo costo que permita la identificación de los agentes etiológicos de la cromoblastomicosis.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener exoantígenos a partir de las diferentes especies que causan la cromoblastomicosis como son *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Cladosporium carrionii* y *Wangiella dermatitidis*
- Obtener sueros hiperinmunes en conejos mediante la aplicación de un esquema adecuado de inmunización con los exoantígenos fúngicos.
- Analizar las pruebas de inmunodifusión entre los exoantígenos y los sueros hiperinmunes respectivos con vistas a establecer las relaciones inmunológicas entre los diferentes agentes etiológicos de esta micosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Las cepas utilizadas fueron *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* y *Wangiella dermatitidis* donadas gentilmente por A. A. Padhye y L. Ajello del Centro de Enfermedades Infecciosas de Atlanta, Georgia.

Medios de Cultivo.

Las cepas se mantuvieron en un medio de agar de Sabouraud (Dextrosa 4 %, Peptona 1%, Agar 1.5%) y se incubaron a una temperatura de 28°C.

Para la obtención de los exoantígenos se utilizó el medio DELP conteniendo dextrosa 3.5%, extracto de levadura 1% y peptona 1%. Este medio se preparó dializando con anterioridad la peptona y el extracto de levadura para evitar moléculas de alto peso molecular que pudieran interferir con los exoantígenos procesados por los hongos. Se dializaron 10 g de extracto de levadura y 10 g de peptona de caseína en 100 ml de agua destilada en tubos de diálisis Nójax de 19 x 84 cm y peso molecular menor a 50000, contra 900 ml de agua destilada durante 24 horas a 4°C en agitación. Al dializado obtenido se le agregó 35 g de dextrosa y se esterilizó 121°C durante 15- 20 minutos.

Antes de la utilización de los tubos de diálisis, para eliminar metales pesados, éstos fueron colocados en un recipiente al cual se agregó una solución de bicarbonato de sodio al 2% en ácido etilendiamino tetracético (EDTA Boehringer Mannheim, 1 86 g / l). Se esterilizaron durante 20 minutos a 121°C y luego se lavaron con agua bidestilada, se conservaron en frascos con agua bidestilada en refrigeración o con azida de sodio a temperatura ambiente. Al momento de ser usados se lavaron también por dentro con agua bidestilada.

Curva de crecimiento

Para las curvas de crecimiento radial se sembró cada cepa en cajas de Petri con medio DELP adicionando 20 g de agar. Cuando la colonia alcanzó un crecimiento de aproximadamente 6 cms de diámetro, se cortaron fragmentos miceliales de 0.5 cm de diámetro con tubos de vidrio estériles. Este inóculo se colocó en el centro de una caja de Petri con el medio de cultivo y se midió el diámetro de la colonia cada tercer día hasta que alcanzó el borde de la caja. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Se realizaron también curvas por consumo de glucosa por el método de fenol sulfúrico (Dubois, 1956). Matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 75 ml del medio DELP dializado se inocularon con 5-6 fragmentos de 0.5 cm de diámetro con cada una de las cepas. Se tomó 1 ml de muestra diariamente durante 20- 25 días. Se realizó por triplicado.

Obtención de los exoantígenos

Los exoantígenos se obtuvieron según la metodología descrita por Standard y Kaufmann (1976). Se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 75 ml de medio líquido DELP con 5 - 6 fragmentos miceliales de 0.5 cm de diámetro de la especie en cuestión. Se incubaron a 28°C durante 22 días en baño María con agitación. Después de este período se verificó la pureza de los cultivos y se trataron con timerosal a una concentración final de 0.02 %. Se dejaron reposar durante 48 horas. El micelio fue eliminado por filtración con papel Whatman # 1 y el filtrado obtenido se esterilizó

nuevamente por filtración con membranas Millipore de 0.45 μm . Luego, se concentró 25 veces por Amicón. El concentrado obtenido se utilizó como exoantígeno y también para inmunizar los conejos para la obtención de los sueros hiperinmunes. Adicionalmente, el medio líquido DELP dializado fue concentrado 25 veces y también fue probado como control contra los exoantígenos de *P. verrucosa*, *F. compacta*, *F. pedrosoi*, *C. carrionii* y *W. dermatitidis* (Fig. 10).

Inmunización y obtención de sueros hiperinmunes de conejo

Los exoantígenos obtenidos a partir de las cinco especies en estudio fueron usados para inmunizar conejos Nueva Zelanda de 2 kg aproximadamente, utilizando 2 animales para cada cepa. Cada animal fue inoculado intramuscularmente con 0.5 ml del exoantígeno y 0.5 ml de adyuvante de Freud, los días 1 y 9. Durante los días 4, 7, 10, 14, 16, 18 y 24 los animales fueron inoculados por vía intravenosa con 0.5 ml de exoantígeno diluido 1:2. Los conejos fueron sangrados el día 28 y el suero obtenido se probó contra los exoantígenos homólogos, a través de la prueba de Inmunodifusión de Ouchterlony (1962). Cuando la respuesta no fue positiva se repitió el mismo esquema de inmunización (Fig. 9) siete días después de la última inoculación, los conejos fueron sangrados de nuevo. Los sueros obtenidos fueron almacenados a -70°C hasta su utilización.

Pruebas de inmunodifusión.

Los sueros obtenidos se probaron contra los exoantígenos homólogos y heterólogos. Para ello se emplearon portaobjetos de vidrio de 2.5 x 7.5 cm cubiertos con 4.5 ml de una solución de agarosa al 1% adicionada de 7.5 % glicina, 0.9% de cloruro de sodio y 0.1 % de azida de sodio a un pH de 7.2. En cada laminilla se realizó el diseño siguiente: en el centro se perforó un pozo con seis oradaciones de alrededor de 3.4 mm de diámetro cada uno. En el pozo central se colocó el antisuero. Los exoantígenos homólogos se colocaron en los pozos inferior y superior de cada diseño y los

exoantígenos heterólogos se depositaron por duplicado en los pozos laterales. Cada laminilla se incubó en una cámara húmeda por 24 h a 26°C o 48 h a 4°C. Las laminillas fueron lavadas con citrato trisódico al 5% durante 3 días para eliminar las reacciones inespecíficas. Después se colocaron en agua destilada durante 24 h. Para secarlas se colocó papel Whatman # 1 sobre cada laminilla y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se tiñeron sumergiéndolas durante 4 minutos en una solución de negro amido (1g de negro amido, 450 ml de ácido acético 1 M y 450 ml de acetato de sodio 0.1 M) Inmediatamente después se lavaron con una solución de ácido acético al 2% durante 5 minutos. En la fig. 8 se presenta el esquema general del trabajo.

RESULTADOS

Las cinco cepas estudiadas crecieron adecuadamente en el medio DELP y la morfología microscópica y microscópica fue similar a la descripción anterior (Figs. 2-6).

En la figura 11 se observan las curvas de crecimiento de las diferentes cepas estudiadas que muestran el crecimiento lento característico de estos hongos. A partir de la dinámica de desarrollo observado mediante estas curvas se eligió utilizar cultivos de 15 días para la obtención de los exoantígenos, calculando que estos microorganismos estarían en ese tiempo en la fase logarítmica de desarrollo. En la figura 12 se observa una banda bien definida entre el suero hiperinmune anti-*P. verrucosa* (AcPv) y su exoantígeno homólogo (Pv) y una banda muy tenue de reacción cruzada con *F. compacta* (Fc). También puede distinguirse la formación de una línea de precipitación común con el exoantígeno de *C. carrionii* (Cc). No existe reacción cruzada con *W. dermatitidis*. En la figura 13 se distingue la reacción entre el suero hiperinmune de *Fonsecaea pedrosoi* (AcFp) y su exoantígeno (Fp) por la presencia de una línea bien definida y bien delimitada de precipitinas. También puede distinguirse una banda de identidad con los antígenos de *C. carrionii* (Cc), *Fonsecaea compacta* (Fc) y *P. verrucosa* (Pv). Es evidente que no existe reacción cruzada con *W. dermatitidis*. En la figura 14 se observa una reacción de precipitinas delgada y bien definida entre los componentes antigénicos obtenidos a partir de *C. carrionii* (Cc), con su suero hiperinmune correspondiente (AcCc). Puede observarse una reacción cruzada con el antígeno de *F. compacta* (Fc) y *P. verrucosa* (Pv). En la figura 15 se distingue solamente una banda ancha y difusa de precipitinas entre el suero hiperinmune de *F. compacta* (AcFc) y el exoantígeno respectivo (Fc). Por último, en la figura 16 se puede observar el suero hiperinmune antiWd (AcWd) y su exoantígeno homólogo (Wd). Este es el único de los hongos estudiados que no presentó reacciones cruzadas entre su exoantígeno y los sueros hiperinmunes heterólogos, ni entre el propio y los productos antigénicos heterólogos del resto de las especies estudiadas.

Los resultados muestran relaciones inmunológicas entre *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Cladosporium carrionii* y la ausencia de relaciones inmunológicas con *Wangiella dermatitidis*.

DISCUSIÓN

En este trabajo fueron observadas reacciones cruzadas entre *F. pedrosoi* con *P. verrucosa*, *F. compacta* y *C. carrioni*. Esto no coincide con los resultados de Nicolaisen y Swatek (1980) quienes encontraron que el suero hiperinmune de *F. pedrosoi* es específico hacia el antígeno homólogo y, por lo tanto, no presentaron reacciones cruzadas con ninguna de las otras especies probadas. Además, estos autores mencionan la presencia de tres bandas de precipitinas, dos bien definidas y una delgada para *F. pedrosoi*, mientras que en este trabajo solamente se distingue una línea delgada entre los componentes antigénicos de esta especie. Lo anterior puede deberse a la diferente reacción del animal de donde se obtuvo el suero hiperinmune. Sin embargo, los resultados obtenidos coinciden con el trabajo de Conant y Martin (1980) quienes reportan reacciones cruzadas para *P. verrucosa* con suero hiperinmune Anti-Fp. La heterogeneidad serológica manifestada por *F. pedrosoi* podría deberse al marcado pleomorfismo que ha caracterizado a esta especie (Ibrahim-Granet y de Bièvre, 1984; McGinnis, 1980), o a la metodología empleada, lo que sería necesario normar para lograr resultados uniformes y reproducibles.

La ausencia de líneas de precipitinas entre los antígenos de *P. verrucosa* y *F. compacta* y sus sueros hiperinmunes respectivos descrita por Nicolaisen y Swatek (1980) contrasta con los resultados de este trabajo, pues como puede observarse en las figuras 12 y 15 las bandas observadas entre los exoantígenos obtenidos a partir de cada uno de estos hongos y sus respectivos antisueros son nítidas y bien definidas. Las variaciones antes mencionadas pudieran depender de factores tales como la respuesta de los animales a las diferentes características antigénicas de cada hongo, así como a las modificaciones que se hicieron en este trabajo, como lo es el hecho de dializar el extracto de levadura y peptona cuyas moléculas pudieran interferir con los exoantígenos obtenidos.

Los resultados obtenidos con *W. dermatitidis* concuerdan con los trabajos de Nicolaisen y Swatek (1980) quienes al probar el antisuero de *W. dermatitidis* contra varios hongos

dematiáceos observaron solamente una reacción de precipitinas contra la especie homóloga.

Los resultados aquí reportados son congruentes con lo observado por Kaufman *et al.* (1980), quienes tampoco encontraron relaciones inmunológicas entre *W. dermatitidis* y otros agentes etiológicos de la feohifomicosis.

La utilidad potencial del método para hongos dematiáceos ha sido demostrado por los trabajos de Espinel-Ingroff *et al.* (1986) al encontrar bandas específicas de precipitación para *P. verrucosa*, *F. pedrosoi* y *Xylohypha bantiana*, antes considerada como *Cladosporium bantianum* y recientemente clasificada por McGinnis *et al.* (1986).

Los resultados aquí presentados demuestran que los exoantígenos de los hongos estudiados, destacando a *F. pedrosoi*, comparten componentes antigénicos y confirman la separación inmunológica de la especie *W. dermatitidis*. El uso de antígenos puede ser útil para el diagnóstico de algunas micosis como esporotricosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis (Iwatsu, 1982). Sin embargo, en el caso de este estudio se plantea la utilidad potencial de la prueba de los exoantígenos exclusivamente para la diferenciación taxonómica del grupo de agentes etiológicos de la cromoblastomicosis, mediante el establecimiento de sus relaciones inmunológicas.

Este método ofrece la ventaja de tener un bajo costo, además de ser de fácil manejo y rápida detección. En general estas pruebas inmunológicas cobran importancia para la identificación de agentes causantes de micosis debido a las limitaciones que implican los exámenes micológicos tradicionales como son el examen directo y el cultivo del agente etiológico. En el primero, a veces es difícil identificar a los hongos en el material biológico correspondiente. Además, las biopsias no siempre son recomendables en determinados procesos patológicos y, en el segundo, la mayoría de los microorganismos causantes de estas micosis presentan un crecimiento lento, de dos a tres semanas, en medios de cultivo. Sin embargo, la realización de pruebas serológicas y el procesamiento de las muestras permite alcanzar una evidencia rápida y presuntiva, y su empleo permitiría discriminar casos de dudas taxonómicas. Por otro lado las pruebas inmunológicas también tienen limitaciones, como son la aparición de reacciones inmunológicas cruzadas derivadas de la presencia de fracciones antigénicas compartidas.

Honbo *et al.* (1986) han demostrado lo importante que resulta adsorber los antisueros con antígenos heterólogos ya que a pesar de las reacciones cruzadas que encontraron entre varias especies del género *Cladosporium* (*C. carrionii*, *C. herbarum*, *C. cladosporioides*) y *X. bantiana*, estos pudieran ser identificados y diferenciados específicamente a través de cuatro factores séricos monoespecíficos obtenidos por el procedimiento de inmunoadsorción.

En la actualidad se ha planteado que además de la caracterización morfológica e inmunológica de las cepas estudiadas también se debe considerar su caracterización molecular. Sin embargo, en la práctica hay que considerar que los reactivos biológicos que se elaboren sean de fácil acceso y bajo costo, por lo cual consideramos que el método de los exoantígenos podría resultar de gran utilidad y apoyo para la identificación de agentes etiológicos de otras micosis

CONCLUSIONES

1. Los agentes causales de la cromoblastomicosis: *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Cladosporium carrionii* presentan reacciones inmunes cruzadas que revelan su similitud antigénica al observarse que los exoantígenos obtenidos a partir de los mismos comparten componentes antigénicos
2. La metodología de los exoantígenos permitió diferenciar y separar de las especies ensayadas a *W. dermatitidis*, agente de la feohifomicosis, al demostrar la ausencia de relaciones inmunológicas entre esta especie y los agentes etiológicos de la cromoblastomicosis.
3. Se recomienda aplicar la inmunoadsorción de antisueros con el objeto de identificar factores séricos monoespecíficos y poder discriminar, con un mayor grado de precisión, los agentes de la cromoblastomicosis mediante la prueba de los exoantígenos
4. El método de los exoantígenos es una técnica útil de bajo costo que permite llevar a cabo la identificación preliminar de los agentes causales de la cromoblastomicosis.

BIBLIOGRAFIA

- Ajello L.** 1977. The black yeast as disease agents: historical perspective. In: Pan American Health Organization Proceedings of the Fourth International Conference on the Mycoses (PAHO Scientific Publication No 356).
- Ajello L.** 1986. Hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis: Two global disease entities of Public Health Importance. *Eur. J. Epidemiol.* 2: 243- 251.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M.** 1996. Introductory Mycology. John Wiley and Sons. New York. 62-69.
- Arellano OF, Tamayo PR, Victoria VR.** 1968. Cuatro casos de cromomicosis por *Cladosporium carrionii* y su tratamiento. *Dermatologia Ibero-latinoamericana.* 3: 305-317.
- Arenas R.** 1994. *Micología Médica Ilustrada.* Interamericana Mc. Graw-Hill, México, 153-164.
- Bonifaz A.** 1990. *Micología Médica Básica.* Ed. Méndez C. pp.187-200.
- Bellanti JA.** 1980. *Inmunología II* Ed. Interamericana. pp. 192-193.

Bennet JE, Kwon-Chung. 1992. Medical Mycology. Philadelphia pp. 337-355

Conant NF. y Martin DS. 1980. The morphological and serological relationships of the various fungi causing dermatitis verrucosa (Chromoblastomycosis). *Amer. J. Trop. Med.* 17: 553-578.

Cole JG. 1986. Models of cell differentiation in conidial fungi. *M. Rev.* 50: 95-132.

Cooper BH. 1985. *Phialophora verrucosa* and other chromoblastomycotic fungi. In: Szanislo P. Ed. Fungal dimorphism with emphasis of fungi pathogenic for humans. Nueva York: Plenum Press, : 263-280.

Deacon JW. 1988. Introducción a la Micología Moderna. Limusa, México. 21-23.

Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA. and Smith F. 1956. A colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal chem.* 28: 350-356.

Espinel'Ingroff A, Shadomy S, Dixon D, and P Boldson. 1986. Exoantigen test for *Cladosporium bantianum*, *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa*. *J. Clin. Microbiol.* 23: 305-310.

Esterre P, Inzan CK, Ramrcel E.R. 1996. Treatment of chromomycosis with terbinafine: Preliminary results of an open pilot study. *British Journ. of Dermatology* 134: 33-35.

Herrera T. y Ulloa M. 1990. El reino de los hongos. Micología Básica Aplicada. UNAM Fondo de Cultura Económica, México pp.407-413.

Honbo S., Padhye AA, Ajello L. 1984. The relationship of *Cladosporium carrionii* to *Cladosphialophora ajelloi*. *Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.* 22: 200- 218.

Honbo S., Standard PG, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. 1986. Antigenic relationship among *Cladosporium* species of medical importance. *Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.* 22: 301- 310.

Ibrahim' Granet, O.and C. de Bièvre. 1984. Study of the conidial development and cleistothecium like structure of some strains of *F. pedrosoi*. Comparison with other close dematiaceae. *Mycopathologia* 84: 181'186.

Iwatsu T, Miyali M, Taguchi H, Okamoto S. 1982. Evaluation of skin test for chromoblastomycosis using antigens prepared from culture filtrates of *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Wangiella dermatitidis* y *Exophiala jeanselmei*. *Mycopathol.* 77: 59-64

Kaufman L. y Standard PG. 1978. Immunoidentification of cultures of fungi pathogenic to man. *Curr. Microbiol.* 1: 135-140.

Kaufman LP, Standard G, Padhye AA. 1980. Serological relationships among isolates of *Exophiala jeanselmei*, *Phialophora jeanselmei*, *P. gougerotii* and *W. dermatitidis*. In: *Superficial, Cutaneous and Subcutaneous Infections. Pan American Health Organization. Scientific Publication No. 396.* pp 252-258, Washington, D.C.

Kaufman L, Standard P, Padhye A. 1983. Exoantigen test for the immunoidentification of fungal cultures. *Mycopathologia* 82:1-12

Lara AR. 1979. Cromomicosis. En : Simposio Syntex. Desarrollo y estado actual de la micología médica en México. Ediciones del Instituto Syntex. México.. 149.

Lowry OH, Rosebrought NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193: 265-275.

Mariat F. 1964. En: Saprophytic and parasitic morphology of pathogenic fungi. Symposia of the Society for General Microbiology, XIV. Gran Bretaña. 85-111.

McGinnis MR. 1980. Recent taxonomic developments and changes in medical mycology. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 109-135.

McGinnis, M. R., D. Borelli y A.A. Padhye. 1986. Reclassification of *Cladosporium bantianum* in the genus *Xylohypha*. *J. Clin. Microbiol.* 23: 1148-1151.

Nicolaisen, L. y F.E. Swatek. 1980. Some studies of exoantigens for the identification of the causative agents of chromoblastomycosis. Pan American Health Organization. Scientific Publication No. 396, pp.259-264. Washington, D:C:

Ouchterlony, O, 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy* 6: 30-54.

Rippon J. 1990. *Micología Médica.* Mc Graw Hill, México. 299-320.

Sekhon A. S., Padhye A.A. (1991). Exoantigens in the identification of medically important fungi. En: Anona, D: K., Ajello L. y Mukerji. (Eds.) *Handbook of Applied Mycology Vol 2: Humans animals and insects.* Marcel Dekker. New York. pp 757-765.

Standard, P. G. y L. Kaufman. 1976. Specific immunological tests for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*, *J. Clin. Microbiol.* 3:191-199.

Tay G. 1994. *Microbiología y Parasitología Médica* Ed. Mendez 2a. de 452-459.

Taylor, J.W., 1995 Molecular Phylogenetic Classification of Fungi. *Arch. of Med.Research.* 307-314 26:

Trejos, A. 1954. *Cladosporium carrionii* n. sp. *Rev. Biol. Trop.*, 2: 15-112

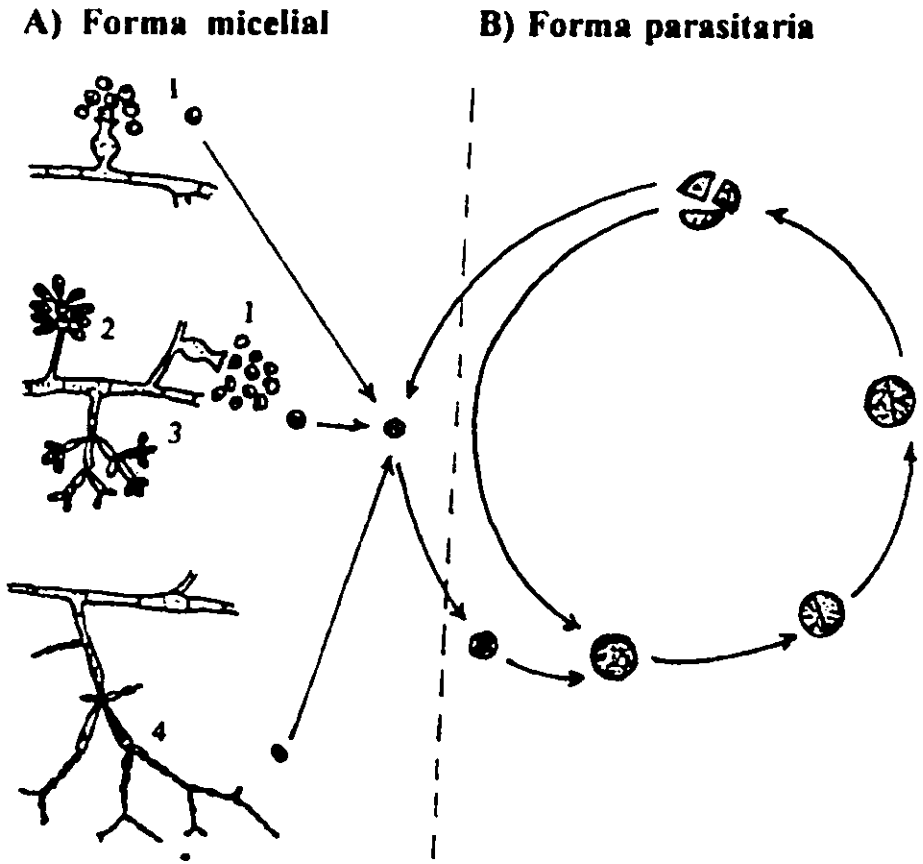


Fig. 1 CONIDIACIÓN

A) Forma micelial de tres tipos: 1. Tipo Fiálide; 2 Tipo Acroteca; 3 y 4. Tipo *Cladosporio* (corto y largo respectivamente) y B) Forma parasitaria de células escleróticas. Modificado de Mariat F. En: Saprophytic and parasitic morphology of pathogenic fungi. Symposia of the Society for General Microbiology, XIV. Gran Bretaña: 1964, 85-111.

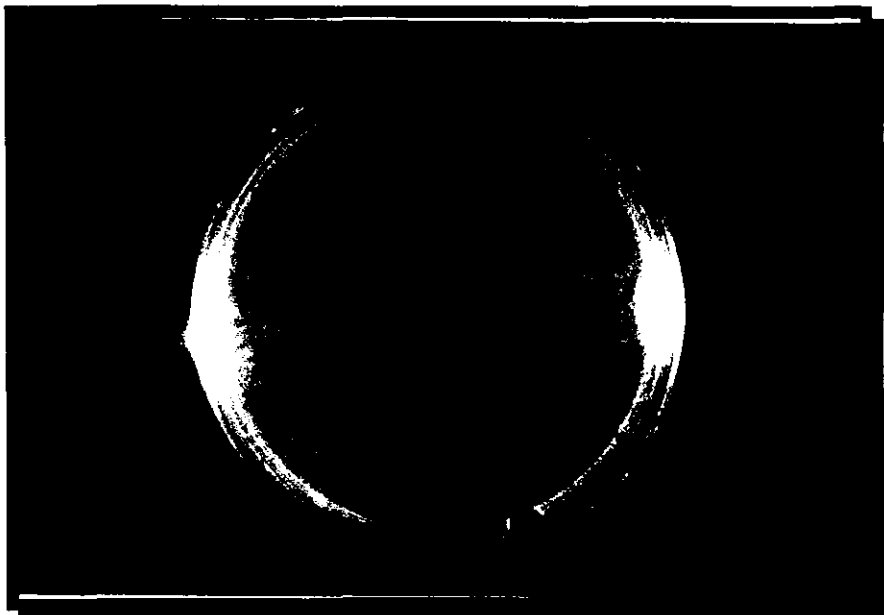


Fig. 2 Colonia de *Fonsecaea pedrosoi* en medio de Agar Papa a los 10 días de crecimiento a 28°C



Fig. 3 Colonia de *Fonsecaea compacta* en medio de Agar Papa a los 10 días de crecimiento a 28°C



Fig. 4 Colonia de *Phialophora verrucosa* en medio de Agar Papa a los 10 días de crecimiento a 28°C

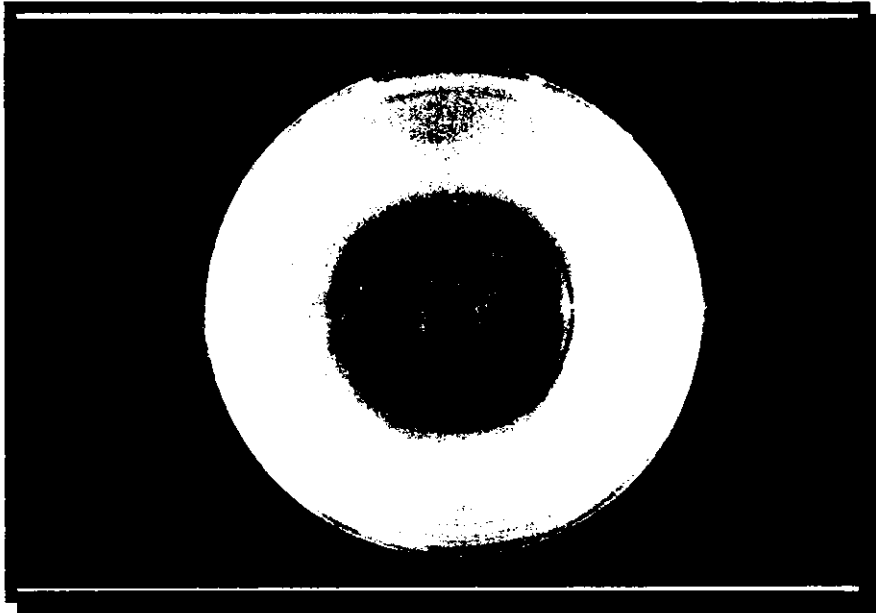


Fig. 5 Colonia de *Cladosporium carrionii* en medio de Agar Papa a los 10 días de crecimiento a 28

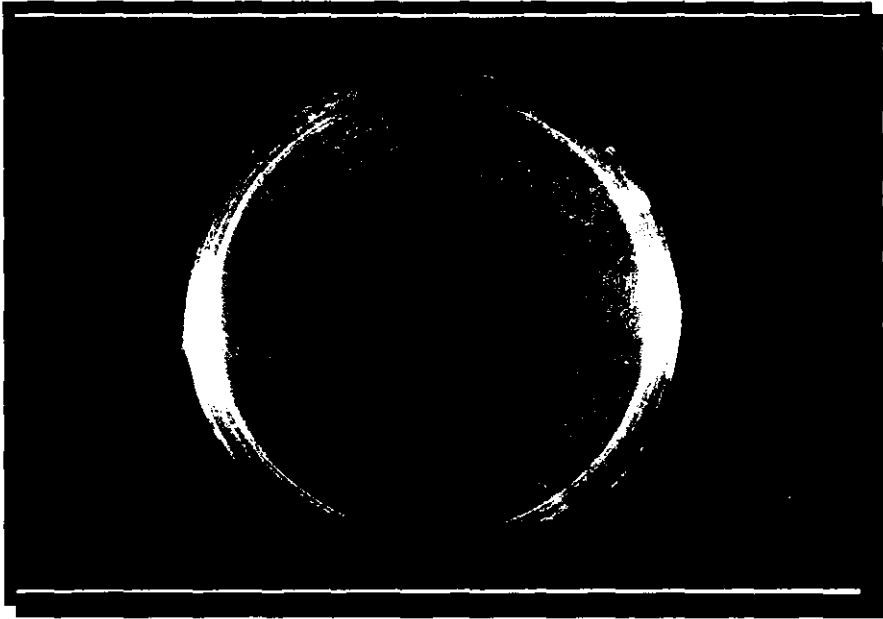


Fig. 6 Colonia de *Wangiella dermatitidis* en medio de Agar Papa a los 10 días de crecimiento a 28° C.

Fiálides

Anélidos

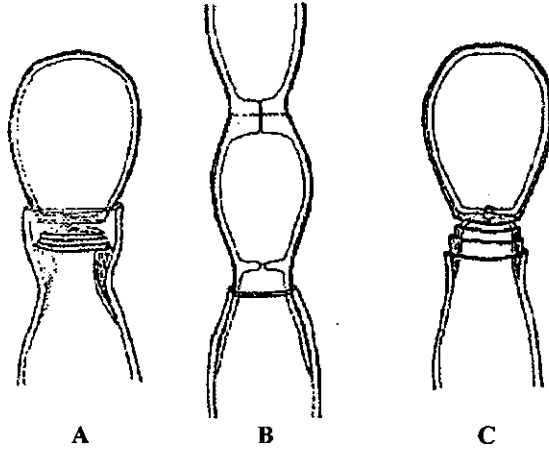


Fig. 7 Arreglo de las capas de la pared celular en el ápice fértil de los fiálides (A; B) y anélidos (C).

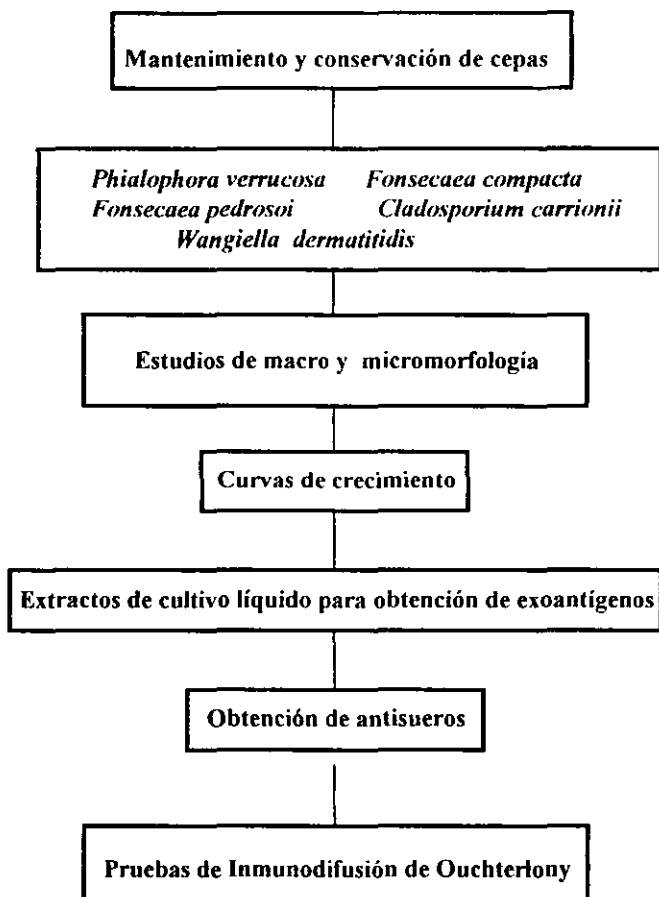


FIG. 8 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

INÓCULO PARA LA INYECCIÓN INTRAMUSCULAR

0.5 ML EXO-AG CONC 25X

0.5 ML ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUD

INÓCULO PARA LA INYECCIÓN INTRAVENOSA:

0.5 ML EXO-AG

DÍAS



1°	1.0 ml INTRAMUSCULAR
4°	1.0 ml INTRAMUSCULAR
7°	1.0 ml INTRAMUSCULAR
10°	0.5 ml INTRAVENOSA
17°	0.5 ml INTRAVENOSA
19°	0.5 ml INTRAVENOSA
24°	SANGRAR

REALIZAR PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DE OUCHTERLONY

FIG. 9 ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

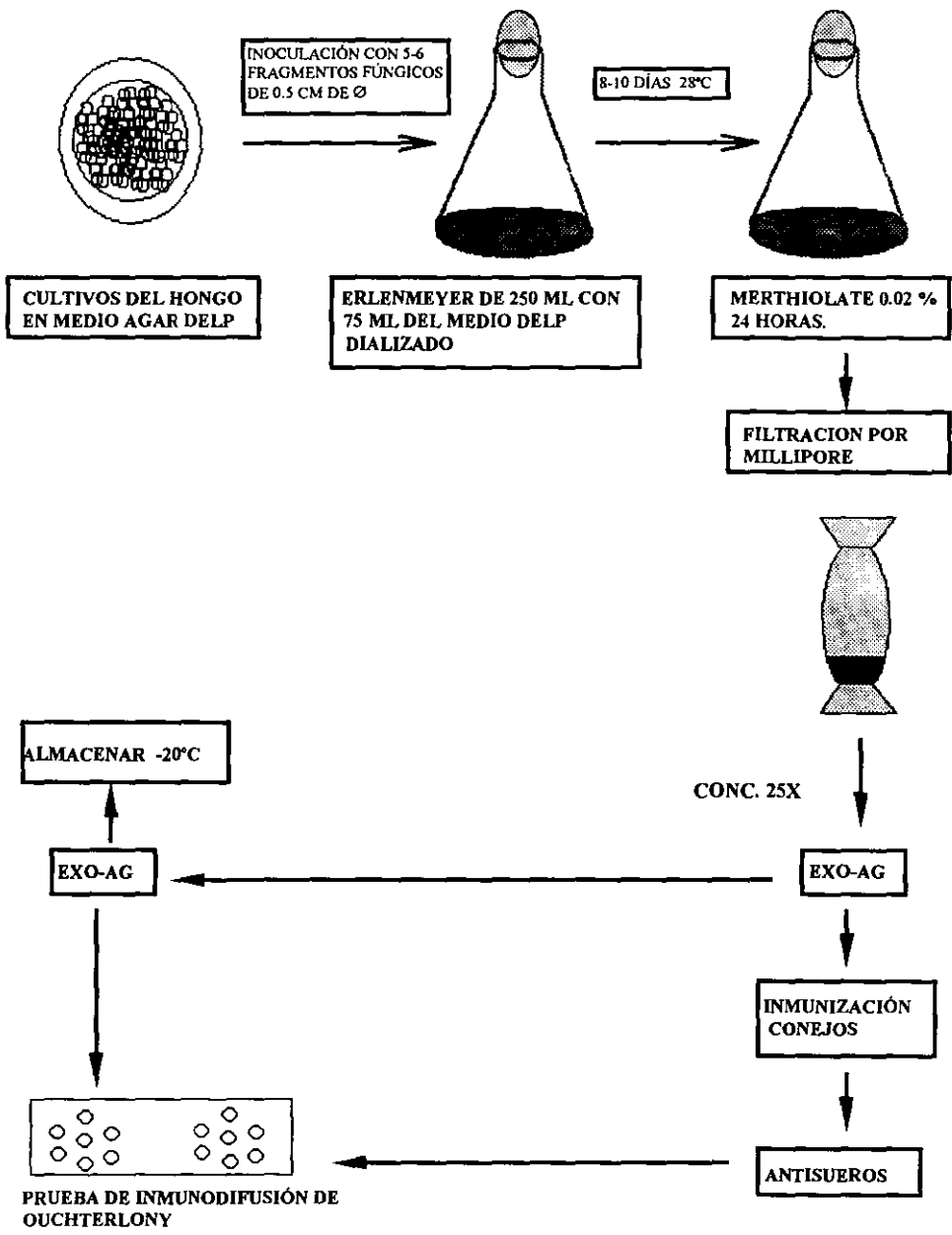


FIG. 10 OBTENCIÓN DE EXOANTÍGENOS

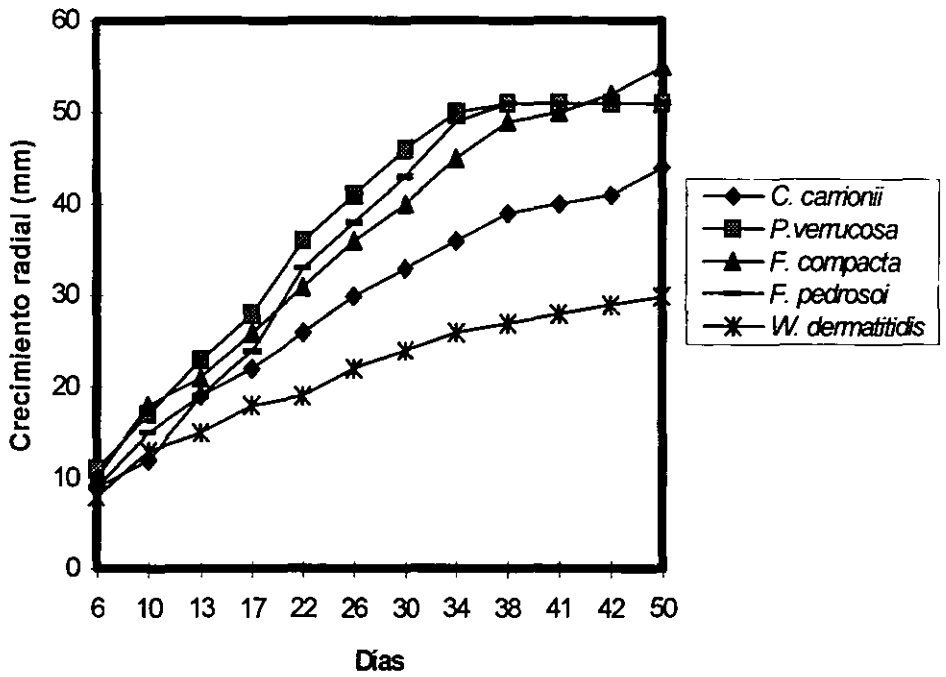


Fig. 11 Crecimiento radial de los diferentes agentes causales de la cromoblastomycosis.

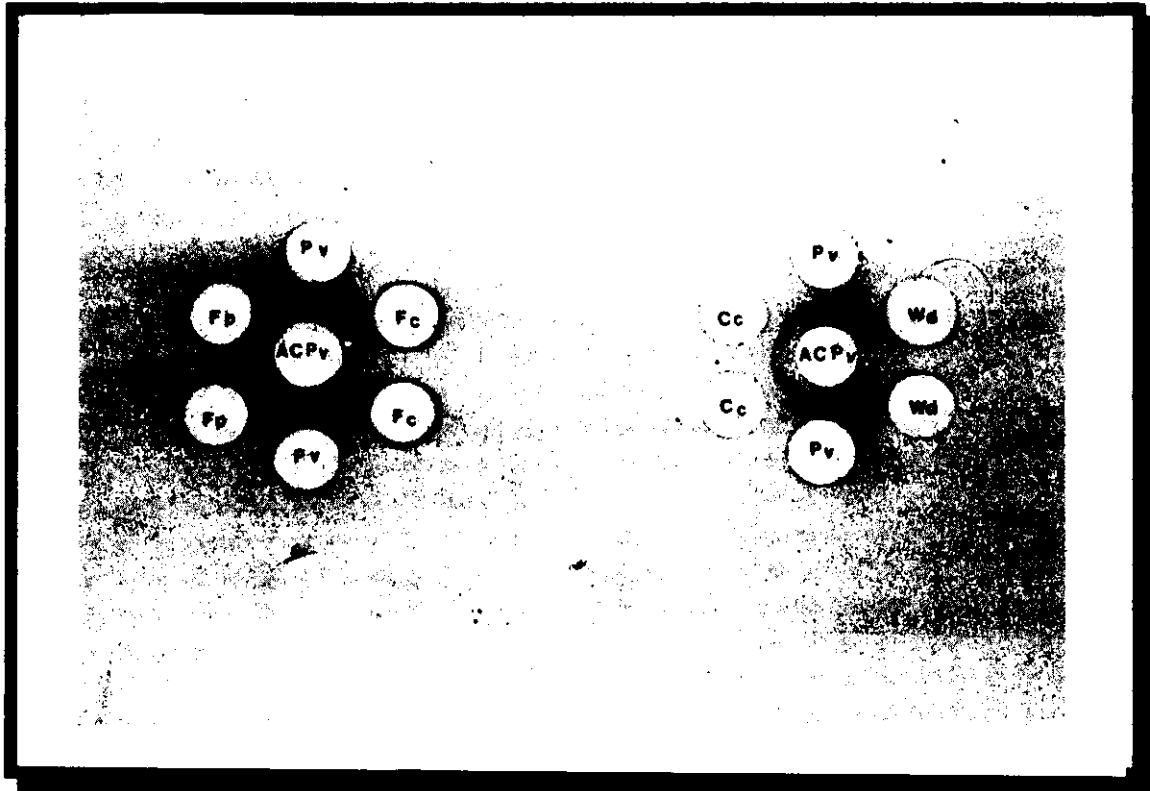
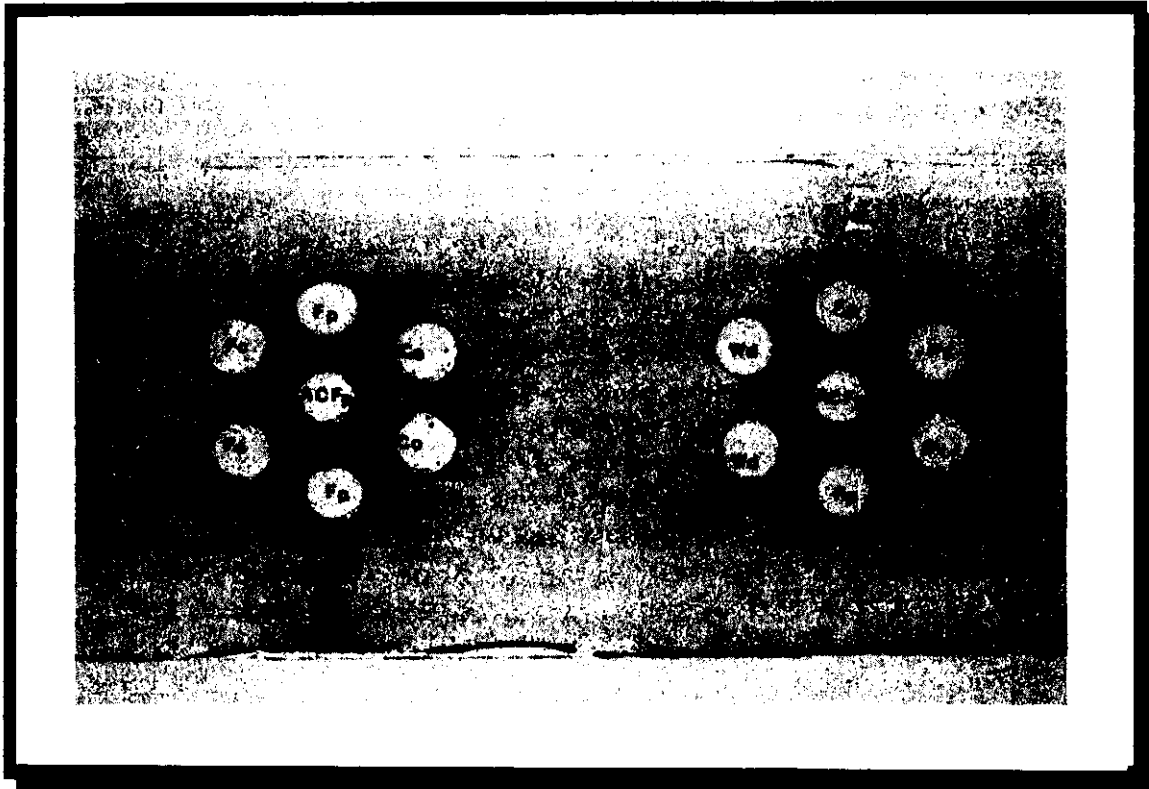


Fig. 12 Inmunodifusión del suero hiperinmune anti- *P. verrucosa* (AcPv) con su exoantígeno homólogo (Pv) en los pozos superior e inferior y los exoantígenos heterólogos de *F. pedrosoi* (Fp), *F. compacta* (Fc), *C. carrionii* (Cc), *W. dermatitidis* (Wd) en los pozos laterales.



ESTA TESTS NO DEBE
SER EN LA BIBLIOTECA

Fig. 13 Inmunodifusión del suero hiperinmune anti- *F. pedrosoi* (AcFp) con su exoantígeno homólogo (Fp) en los pozos superior e inferior y los exoantígenos heterólogos de *P. verrucosa* (Pv), *F. compacta* (Fc), *C. carrionii* (Cc) y *W. dermatitidis* (Wd) en los pozos laterales.

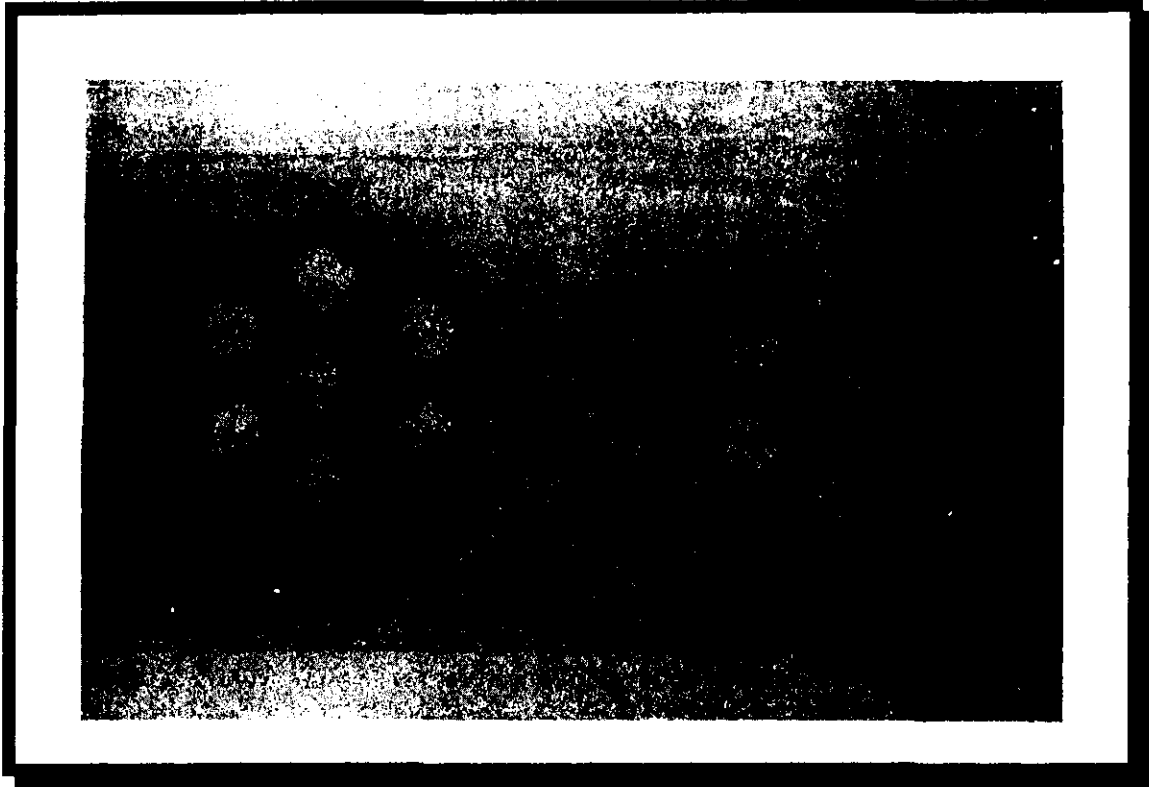


Fig. 14 Inmunodifusión del suero hiperinmune anti- *C. carrionii* (AcCc) con su exoantígeno homólogo (Cc) en los pozos superior e inferior y los exoantígenos heterólogos de *F. pedrosoi* (Fp), *F. compacta* (Fc), *P. verrucosa* (Pv) y *W. dermatitidis* (Wd) en los pozos laterales.



Fig. 15 Inmunodifusión del suero hiperinmune anti- *F. compacta* (AcFc) con su exoantígeno homólogo (Fc) en los pozos superior e inferior y los exoantígenos heterólogos de *F. pedrosoi* (Fp), *P. verrucosa* (Pv), *C. carrionii* (Cc) y *W. dermatitidis* (Wd) en los pozos laterales.

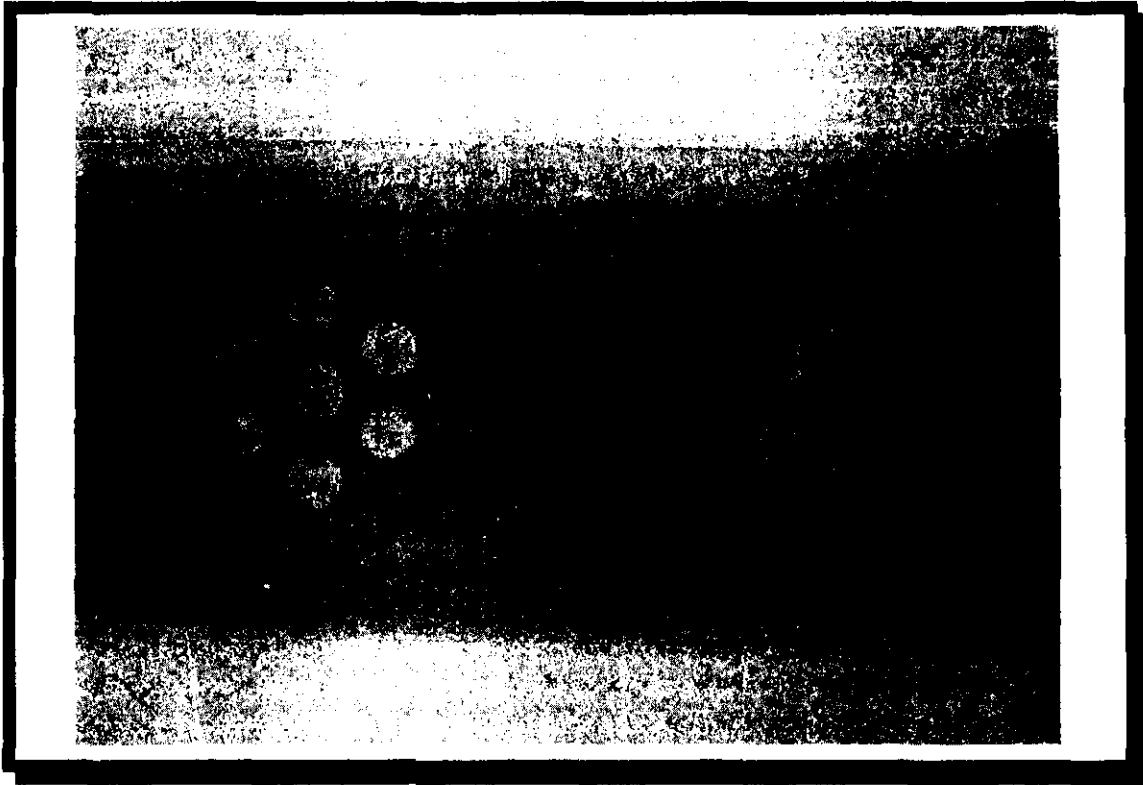


Fig. 16 Inmunodifusión del suero hiperinmune anti-*W. dermatitidis* (AcWd) con su exoantígeno homólogo (Wd) en los pozos superior e inferior y los exoantígenos heterólogos de *F. pedrosoi* (Fp), *F. compacta* (Fc), *C. carrionii* (Cc) y *P. verrucosa* (Pv) en los pozos laterales.