

2ej  
8



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"OBTENCION Y VALORACION COMPARATIVA  
DE ESPOROTRICINA DE LA FASE MICELIAL Y  
LEVADURIFORME"**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**GABINA ARENAS LOPEZ**

**MEXICO, D. F.**

**1986**



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.

## I N D I C E

	Pags.
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES .....	1
Planteamiento del Problema .....	6
Objetivos .....	8
MATERIAL Y METODOS .....	9
1. Hongos .....	"
2. Medios de Cultivo .....	"
3. Condiciones de Cultivo .....	11
4. Obtención de Antígenos Metabólicos .....	12
5. Curvas de Crecimiento .....	"
6. Métodos Químicos .....	13
7. Métodos Inmunológicos .....	"
RESULTADOS .....	15
DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	18
LISTA DE TABLAS .....	22
LISTA DE FIGURAS .....	23
BIBLIOGRAFIA .....	24

## INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

La esporotricosis es una micosis subcutánea producida por Sporothrix schenckii que afecta al hombre y animales, de evolución subaguda o crónica, granulomatosa que ataca piel y tejido subcutáneo y tiene la característica de presentar nódulos a lo largo del trayecto linfático. Asimismo, puede afectar hueso, pulmón, articulaciones, mucosas y sistema nervioso central (52). El mecanismo de infección más frecuente es a través de un traumatismo en piel con material contaminado con la forma micelial del hongo, que al penetrar al organismo se transforma en su forma parasitaria o levaduriforme (12). Además de las formas típicas de ésta enfermedad, en la literatura se ha informado de casos pulmonares adquiridos por vía respiratoria (32, 43), los cuales son muy difíciles de diagnosticar.

Las características clínicas de la esporotricosis dependen por un lado del mecanismo de infección y por otro, del estado inmunitario del individuo (32, 52). Las formas clínicas más frecuentes pueden ser englobadas en:

- a) Esporotricosis linfangítica. Se inicia con una lesión nodular "chancro-esporotricósico", que se disemina posteriormente a través de los vasos linfáticos con la formación de lesiones secundarias nodosas supurativas, que producen gomas. La localización más frecuente es en miembros superiores e inferiores, siendo este cuadro la forma típica de la enfermedad (32, 52) (Fig. 1).
- b) Esporotricosis fija. Las lesiones se restringen al sitio de la inoculación y son placas ulceradas, verrucosas, infiltradas o eritomasas que no involucran linfáticos regionales (52).
- c) Esporotricosis diseminada. Es una forma secundaria de la enfermedad que se disemina a partir de un foco primario cutáneo o pulmonar y puede involucrar articulaciones, huesos, mucosas, vísceras o sistema nervioso central (6, 36).

.....

- d) Esporotricosis pulmonar primaria. Esta forma clínica es poco conocida, sin embargo, el mecanismo de infección es diferente a las formas anteriores, ya que se contrae por la inhalación de la forma infectante. El cuadro clínico se confunde fácilmente con tuberculosis y se presenta sobre todo en individuos con deficiencia en el sistema inmune (32,43).

El agente etiológico Sporothrix schenckii, pertenece a la clase de los - - - Hyphomycetes, descrito por primera vez por Hektoen y Perkins en 1900 (38). Es un hongo dimórfico que presenta dos formas: micelial y levaduriforme. La forma micelial se encuentra en la naturaleza y en los medios que se utilizan rutinariamente en el laboratorio a temperatura ambiente (Fig. 2). Las colonias son membranosas, limitadas y en los primeros días tienen una coloración blanca o crema y en algunas cepas, a medida que transcurre el tiempo se tornan oscuras. Las colonias están formadas por hifas septadas de un diámetro de 1 a 2  $\mu$  m; presentan conidias piriformes, elongadas u ovoides de 1.5 a 3  $\mu$  m que forman simpodios apicales, de ahí el nombre de simpodio-conidias. En cultivos viejos se observan conidias cónicas o triangulares, pigmentadas, de paredes gruesas con alto contenido de melanina (38). La forma levaduriforme o parasitaria del hongo consta de células fusiformes u ovoides con un tamaño de 2.5 a 5 por 3.5 a 6.5  $\mu$  m y se multiplican por gemación simple o múltiple (Fig. 3).

El hongo se encuentra frecuentemente en la naturaleza, en suelo y vegetales y se asocia a lugares donde hay pinos y eucaliptos con temperaturas superiores a 15°C.

La esporotricosis es una micosis cosmopolita, rara en Europa, aunque allí fue descrita por primera vez por DeBeurmann y Cougerot en Francia (52), frecuente en Asia (Japón) y Oceanía (Australia). En el continente americano se encuentra principalmente en América del Sur y Centroamérica, con cierto predominio en Uruguay, Colombia, Guatemala y México (32). En la República Mexicana, es un padecimiento que ocupa los primeros lugares entre las micosis subcutáneas (31). Existe mayor frecuencia en la meseta central del país sobre todo en el Distrito Federal. Otras regiones con incidencia elevada son la región norte de la Sierra de Puebla, Jalisco, Nuevo León, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca y Veracruz (32,67).

.....

La esporotricosis se considera una micosis de tipo ocupacional que afecta principalmente a floristas, campesinos, alfareros, carpinteros y personas que están en contacto con restos vegetales (15,32). Afecta por igual a hombres y mujeres y el mayor número de casos se presentan en adultos jóvenes (32). Sin embargo, en México existe un gran número de casos de la enfermedad en niños - (31).

En las minas auríferas del África del Sur, se presentó la mayor epidemia de esporotricosis en la historia, con casi 3000 casos, donde la principal fuente de infección se encontró en la vigas de soporte de la mina. La aplicación de fungicida terminó con esta fuente de infección (52).

En Guatemala los traumatismos producidos por la manipulación de los peces Tilapia mozambica y Cichlasoma gutulatum, por los moradores y pescadores ocasionales del lugar en la laguna de Ayarza, fueron un mecanismo frecuente de infección en esta zona, donde se registraron más de 50 casos de esporotricosis (40).

En los restos vegetales de las cuevas de armadillos Dasypus novemcinctus y D. septemcinctus del Uruguay, se ha encontrado el hongo y la cacería de estos mamíferos, ha ocasionado la enfermedad en personas dedicadas a esta actividad (7).

Por otro lado, en Puebla México, se aisló el agente etiológico del suelo de una hugarbilia, localizada en el patio casero de una familia infectada (32). Asimismo, la presencia del hongo en zacaté Panicum purpuranscens material de empaque utilizado por los artesanos de cerámica y empacadores de fruta y la alta positividad a la prueba intradérmica con antígeno de S. schenckii, indica una importante fuente de contaminación (66).

Teniendo en cuenta que la esporotricosis es una micosis subcutánea frecuente - existen a la fecha diversos métodos para el diagnóstico micológico. El cultivo de S. schenckii a partir de especímenes clínicos es un método inequívoco. - Se utilizan medios como Sabouraud o Sabouraud con antibióticos y la aparición de colonias características del hongo a los 3-5 días de incubación, representa

el diagnóstico de certeza (12). Los exámenes directos de muestras biológicas tienen poco valor, por la dificultad de encontrar la forma parasitaria o cuerpo por asteroideos a pesar de la facilidad de obtención del cultivo, además de que su búsqueda en cortes histopatológicos no son patognómicos, debido a que se pueden encontrar en otras infecciones bacterianas o micóticas (12,52). Utilizando anticuerpos marcados con fluoresceína o sistemas inmunoenzimáticos es posible poner de manifiesto la presencia del hongo (14,45,54).

La prueba intradérmica con antígenos metabólicos de S. schenckii denominados esporotricinas es ampliamente utilizada como apoyo diagnóstico de estamiosis, ésta produce una hipersensibilidad tardía específica en individuos infectados (15,16,2,32,60).

A las pruebas serológicas se les ha dado poco valor en las formas fijas y linfangítica de la enfermedad, ya que fácilmente se obtiene el cultivo, sin embargo, adquieren importancia en las formas sistémicas y extracutáneas. Las más utilizadas son la determinación de precipitinas, aglutininas, fijación de complemento e inmunofluorescencia (1,4,28,60). Sin embargo, la presencia de anticuerpos en individuos no esporotriciósicos les ha restado cierto valor - (4,24).

Entre los antígenos empleados para el diagnóstico de la esporotricosis se encuentran concentrados de filtrados de cultivos (37), células completas (15,28), paredes celulares (5) y fracciones polisacáridicas crudas (1,16,60). En hongos, los complejos polisacárido-proteína, son antígenos importantes y a partir del aislamiento y purificación de un antígeno de esta naturaleza por González Ochoa y Soto Figueroa en 1947 (16) quienes utilizaron en pruebas intradérmicas con óptimos resultados, se inició toda una serie de investigaciones orientadas a obtener el mejor método de extracción y elucidar sus características químicas e inmunológicas.

Entre los diferentes azúcares que constituyen el polisacárido de S. schenckii, se encuentra la ramnosa, azúcar que no ha sido detectada en otras entidades fúngicas patógenas, lo que le confiere cierta especificidad (60).

Los polisacáridos de filtrados de cultivos (metabólicos) están constituidos por componentes de pared celular y de diferentes metabolitos del hongo, - que son liberados y disueltos en el medio donde crece (60).

Toriello y Mariat (60) establecieron las diferencias que existen entre - los polisacáridos aislados de células levaduriformes y los liberados al medio, estos últimos mostraron mayor complejidad y contenido de galactosa. Además es - tablecieron que la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo donde - crece el hongo, puede alterar la composición química del polisacárido.

En 1970 Ishizaki (33) aisló y determinó la composición química de un gli- - copéptido con actividad inmunológica y encontró que estaba compuesto por ranno - sa (28%), manosa (34.5%), galactosa (5.4%), glucosa (1.8%) y una fracción pep- - tídica (15%).

Al año siguiente Lloyd y Bitoon (33), utilizaron técnicas más elaboradas y obtuvieron una rannomanana con la siguiente composición: manosa (20%), rannosa (44%) y una fracción peptídica (16%). El péptido contenía principalmente treó - nina (14.2%), serina (13.2%), ácido aspártico (9.6%) y ácido glutámico (9%); - la precipitación con concanavalina A mostró la presencia de residuos manosil - terminales. Por otro lado, Travassos *et al.* (41,61-65) obtuvieron polisacári - dos del hongo por medio de una extracción alcalina con KOH 2% y enriquecieron - el contenido de rannomananas, por medio de una precipitación con reactivo de - Fehling. El producto obtenido contenía rannosa, manosa y una proporción menor de 1% de nitrógeno. Las rannomananas constituyeron los compuestos de mayor es - pecificidad, sin embargo, se encontraron otros polisacáridos como galactomananas, glucanas y amilosa (63). Asimismo encontraron que en las etapas tempranas de el crecimiento del hongo existe síntesis de mananas (59). Además obser - varon que las estructuras finas de los polisacáridos, variaban dependiendo de - las condiciones de cultivo y por lo tanto de la morfología celular. En culti - vos miceliales encontraron la presencia de diramosil-rannomananas, compuestas por una cadena principal de unidades  $\alpha$ -D-manopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) y cadenas laterales 0-  $\alpha$ -D-rannopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) rannopiranosas. Por otro lado, determinaron que las levaduras y conidias están compuestas por una cadena prin - cipal igual a la de la forma micelial, pero contenía cadenas laterales de uni - dades terminales no reductoras de  $\alpha$ -L-rannopiranosas (Fig. 4) (41,63). En resu

.....

men observaron que la forma levaduriforme contiene cadenas laterales monoramno sil y la forma micelial cadenas diramosil, éstas últimas parecen ser las determinantes específicas del antígeno fúngico.

La reactividad serológica cruzada entre S. schenckii y ciertas especies de hongos fitopatógenos relacionados como Ceratocystis, Europhium y Graphium - está dada por la estructura inmunodominante de la forma levadura de S. schenckii que se encuentra en estos hongos (26).

Ciertas bacterias como Leuconostoc mesenteroides, Streptococcus pneumoniae y Aerobacter aerogenes en las que el determinante inmunológico son unidades no reductoras de ramosa terminales ocasionan también reactividad cruzada, por lo que el contacto inmunosensibilizante con alguna de ellas podría ser la causa - de pruebas positivas en inmunodifusión o títulos bajos de aglutininas en pacientes no esporotricóicos (4,24,44).

La presencia de unidades  $\alpha$ -D-manopiranosas en levaduras y galactomananas de Exophiala werneckii, Trichophyton rubrum y Aspergillus fumigatus son estructuras semejantes a aquellas sintetizadas en la fase temprana de crecimiento de S. schenckii y por lo tanto, estos hongos podrían presentar cruces inmunes entre sí (2,37,55). Los elementos que producen los fenómenos inespecíficos, se podrían reducir en forma importante si se realiza una selección adecuada del método de extracción y se controlan las condiciones de cultivo, lo que redundaría en beneficio de los antígenos utilizados en las pruebas serológicas de la enfermedad.

#### Planteamiento del Problema.

Como se ha visto en los párrafos anteriores, en la actualidad se cuenta con trabajos sobre la composición química de los antígenos de S. schenckii (4,42,37, 60-65). Sin embargo, la elaboración de antígenos muy purificados y específicos no está al alcance de todos los laboratorios de serodiagnóstico micológico. - - Otro de los principales problemas que se presenta en la elaboración de estos antígenos es la falta de reproducibilidad de los resultados entre diferentes cen-

.....

tros de producción. Las variaciones que existen entre las cepas utilizadas, medios de cultivo y condiciones de incubación, además del método de extracción - originan diferencias en la composición y actividad biológica. Por lo tanto, es de suma importancia llegar a una estandarización de estas moléculas antigénicas. Para poder empezar esta estandarización, en el presente trabajo se obtuvieron - antígenos de las formas micelial y levaduriformes de Sporothrix schenckii en diferentes fases de crecimiento, tratando de obtener las condiciones óptimas de - producción y actividad biológicas, para lo cual se llevaron a cabo diferentes - pruebas inmunológicas en pacientes con esporotricosis. Los resultados obtenidos no sólo nos conducirían a elaborar un modelo de estandarización, que podría ser aplicado a otros hongos, sino también a la obtención de una fracción con - actividad inmunológica con las cualidades necesarias para la obtención de un - buen antígeno: especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y de fácil obtención a un bajo costo.

## OBJETIVOS

- Disponer de antígenos de Sporothrix schenckii para el diagnóstico inmunológico de la esporotricosis.
- Obtener las condiciones óptimas de producción y actividad antigénica de esporotricina micelial y levaduriforme.
- Comparar la actividad inmunológica de los antígenos miceliales y levaduriformes de Sporothrix schenckii.
- Establecer las bases para la elaboración de un modelo experimental para la estandarización de antígenos fúngicos.

## MATERIAL Y METODOS

### 1) Hongos

Dos cepas de Sporothrix schenckii (116-83 y 705-78) fueron utilizadas en el trabajo. Se aislaron de casos humanos de esporotricosis, la primera del Hospital General de México, S.S. y la segunda del Centro Dermatológico Pascua, S.S.

### 2) Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en el mantenimiento y producción de los antígenos metabólicos de S. schenckii fueron los siguientes:

A) Medio de Sabouraud (BIOXON). Se utilizó en el mantenimiento de las cepas, control de viabilidad, microbiológico y esterilidad.

- Dextrosa	20	g
- Peptona de carne	10	g
- Agar	15	g
- Agua c.b.p.	1000	ml

pH 5.6

B) Medios para crecimiento en fase levaduriforme y fase micelial. Se utilizaron en la producción de los antígenos metabólicos:

Medio I. Para la fase levaduriforme de S. Schenckii:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.91	g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2.38	g
- $\text{MgSO}_4$	0.6	g
- KCl	1.0	g
- Arginina	1.0	g

.....

- Solución de oligoelementos de Berthelot	0.5	ml (*)
- Tiamina	$10^{-6}$	g
- Biotina	$10^{-9}$	g
- Glucosa	20	g
- Agua c.b.p.	1000	ml
pH	6.8	

Medio II. Para la obtención de la fase micelial del hongo.

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.6	g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.75	g
- Hidrolizado de caseína	3.0	g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5	g
- $\text{CaCl}_2$	0.1	g
- $\text{NaCl}$	0.1	g
- Glucosa	20.0	g
- Glicerol	10.0	g
- Solución de oligoelementos de Berthelot	0.5	ml (*)
- Tiamina	$10^{-6}$	g
- Extracto de levadura (dializado)	1.0	g
- Agua c.b.p.	1000	ml
pH	6.5	

(\*) Solución de oligoelementos de Berthelot

- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	50	g
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2	g

.....

- CaSO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0.5	g
- NiCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0.05	g
- CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0.05	g
- Ti <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.2	g
- ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.1	g
- CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0.05	g
- GI <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0.01	g
- H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05	g
- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	1.0	ml

filtrar sobre papel

C) Medio de tioglicolato (BIOXON). Se empleó en el control de esterilidad de los antígenos.

- Peptona de caseína	15	g
- L-cistina	0.1	g
- Dextrosa	5.0	g
- Extracto de levadura	5.0	g
- NaCl	2.5	g
- Tioglicolato de sodio	0.5	g
- Resazurina	0.001	g

### 3) Condiciones de cultivo

Para la obtención de la forma levaduriforme, se sembró el hongo en matraces de 250 ml conteniendo 80 ml del medio I. Se incubó a 37°C por 48 h - en agitación. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 350 g por - 15 min y el sedimento se pesó. El inóculo consistió de 200 mg de peso húmedo, sembrado en matraces con las mismas condiciones que los anteriores. Se obtuvieron muestras cada tres días, hasta completar un período de un mes.

.....

La forma micelial se obtuvo también en matraces de 250 ml con el medio - II. Los cultivos se incubaron a 26°C por una semana en agitación. Luego se separó la biomasa por centrifugación a 350 g durante 15 min. El sedimento se maceró en un mortero en condiciones de esterilidad hasta la obtención de un inóculo homogéneo. Se sembraron 200 mg de peso húmedo del hongo en cada matraz y se incubaron a 26°C. Se tomaron muestras para procesar antígenos miceliales cada semana hasta completar un tiempo de incubación de 3.5 meses. Antes de obtener el antígeno se verificó el crecimiento típico del hongo y se realizó control microbiológico. Al cabo del tiempo de incubación los hongos fueron muertos con formaldehído (al 2% de concentración final) por 24 h. Se hicieron pruebas de viabilidad en medio de Sabouraud.

#### 4) Obtención de antígenos metabólicos (Fig. 5)

La obtención de antígenos metabólicos miceliales y levaduriformes se realizaron de acuerdo al método de Toriello y Mariat (60). Los cultivos tratados con formaldehído fueron centrifugados a 350 g por 20 min. El sobrenadante se filtró primero por Seitz y luego se esterilizó por medio de membranas Millipore de 0.45  $\mu$ m. Enseguida se dializó contra agua destilada por 24 h a 5°C, en tubos Spectrapor que permiten el paso de moléculas de hasta 6000 a 8000 de P M cambiando el agua varias veces. El antígeno se concentrado se precipitó con 4 volúmenes de alcohol etílico al 95% en presencia de acetato de sodio al 1%. El precipitado se separó por centrifugación y se disolvió nuevamente en agua destilada. Esta operación se repitió tres veces. Después de la última precipitación, el antígeno se secó con acetona.

#### 5) Curvas de crecimiento

La determinación del crecimiento del hongo se midió por medio del consumo de azúcar en el medio de cultivo. Se tomaron muestras diariamente de matraces inoculados en las mismas condiciones descritas con anterioridad. Las muestras fueron filtradas con membranas Millipore y los azúcares reductores se determinaron por el método de la o-toluidina (8).

.....

6) Métodos químicos

A todos los antígenos se les determinaron proteínas por el método de Lowry (35) y carbohidratos totales por el método del fenol sulfúrico (11).

7) Métodos inmunológicosObtención de sueros hiperinmunes

Se inmunizaron conejos Nueva Zelanda, machos, de aproximadamente 3 kg de peso, siguiendo el esquema de Toriello y Mariat (60). Se preparó una suspensión de células levaduriformes de *S. schenckii* muertas con formaldehído (al 2% de concentración final) a una concentración de  $1 \times 10^8$  levaduras/ml. Se aplicó 1 ml de esta suspensión en la vena marginal de la oreja del animal, 3 veces/semana durante dos semanas. Una semana después de la última-inoculación se realizó una sangría de prueba. El suero obtenido se guardó en alícuotas de 2 ml con azida de sodio al 0.01 % en congelación.

Sueros humanos

Los sueros de pacientes con esporotricosis fueron obtenidos del Hospital - General de México, S.S. y del Centro Dermatológico Pascua, S.S. También - se obtuvieron sueros de pacientes aspergilosos, histoplasmosos y de diversas neumonías del Instituto de Enfermedades Respiratorias, S.S., para los - estudios de reactividad cruzada.

Inmunodifusión

Las pruebas de inmunodifusión (ID) se realizaron según la técnica de - - - Ouchterlony (47) para la cual se utilizó: agar noble, 1 g; azida de sodio, 0.01 g; cloruro de sodio, 0.85 g; glicina, 7.5 g y agua c.b.p. 100 ml. - - Las placas se leyeron a las 48 h de incubación a 4°C, se lavaron con citrato de sodio al 5% por una hora y con solución salina por 24 h, cambiando - la solución varias veces. Las láminas se cubrieron con papel filtro y se - secaron a temperatura ambiente. Por último, se tñieron con una solución - de: negro amido, 1 g; ácido acético 1 M, 40 ml; acetato de sodio 0.1 M, - 450 ml y glicerol 100 ml, durante un minuto.

Los antígenos utilizados en las reacciones de precipitación se probaron a diferentes concentraciones: 1,2,5,10 y 15 mg/ml en solución de cloruro de sodio al 0.85 % conteniendo azida de sodio al 0.01 % como preservador y se almacenaron a 4°C.

### Contrainmunolectroforesis

La prueba de contraimunolectroforesis (CIE) se llevó a cabo con dietilbarbiturato como amortiguador. Se preparó éste con: Barbitál sódico, 13.33 g; acetato de sodio trihidratado, 8.83 g y se llevó a 1.5 l con agua destilada. Se le adicionó ácido clorhídrico 0.1 N hasta llegar a un pH de 8.2 con una fuerza iónica de 0.02. El amortiguador concentrado se diluyó 1:2 para su uso en la cámara de electroforesis. Para los geles de soporte se hizo una dilución 1:10 de este mismo amortiguador y se adicionó azida de sodio al 0.01 % y agarosa al 1%. El corrimiento de las muestras se hizo con un voltaje a  $1 \text{ V/cm}^2$  durante 30 minutos.

### Intradermoreacción

Para las soluciones antigénicas utilizadas en la prueba de intradermoreacción (IDR) se realizaron diluciones 1/2000 y 1/4000 en solución salina fenolada (1/9000) y se esterilizaron por filtración. El envasado se realizó en viales con dos ml de la solución antigénica cada uno. Luego se realizó un control de esterilidad del producto, en medio de Sabouraud, tioglicolato y caldo nutritivo.

La reacción cutánea se hizo inyectando 0.1 ml del antígeno en forma intradérmica en la cara anterior del antebrazo. La prueba se consideró positiva, cuando se presentó la induración y eritema igual o mayor de 5 mm.

.....

## RESULTADOS

Las curvas de crecimiento de la forma levaduriforme y micelial de Sporothrix schenckii se pueden observar en las figuras 6 y 7 respectivamente. El crecimiento del hongo se determinó por medio del consumo de azúcar del medio de cultivo. - En la curva de crecimiento de la forma levaduriforme, se observó que el hongo llega a la fase estacionaria el día 12, mientras que la forma micelial el día 35. - En la obtención de los complejos antigénicos, las condiciones se mantuvieron constantes en cada forma y sólo se varió el tiempo de incubación. Para la forma levaduriforme se tomaron muestras cada tres días durante un mes, para obtener antígeno y en la forma micelial cada siete días durante un total de 135 días. En los antígenos obtenidos antes del inicio de la fase exponencial, se observó escaso o nulo rendimiento para las dos formas. En la figura 8 se muestra el contenido de proteína y carbohidratos totales en los antígenos de la forma levaduriforme de S. schenckii durante los 30 días de incubación. El porcentaje de carbohidratos varió de un 32 a 73 %, el valor mínimo (32 %) se encontró al inicio de la fase exponencial (3 días) y el máximo (73 %) al inicio de la fase estacionaria (15 días); se observó un aumento constante del porcentaje de carbohidratos durante la fase logarítmica del crecimiento del hongo. En la fase estacionaria se observó un porcentaje polisacárido similar (67-73 %), acompañado de una disminución (43 %) al finalizar la curva de crecimiento (30 días). La cantidad de carbohidratos fue aproximadamente 7 veces mayor con respecto a la de proteínas. En el contenido proteico se observaron valores que variaron de 6.6 a 12%, siendo los valores muy similares durante los 30 días.

En la fase micelial (Fig. 9), los porcentajes de carbohidratos mostraron similitud en cuanto a los porcentajes, durante las fases exponencial y estacionaria, luego disminuyó gradualmente hasta un valor mínimo de 46% en el día 135 de incubación del hongo. La relación de carbohidrato/proteína varió aproximadamente de 12 a 1. Por otra parte, en la determinación de proteínas de los antígenos se observaron valores parecidos durante las fases de crecimiento (4.5 a 6%), excepto un valor máximo (8.8 %) al finalizar el tiempo de incubación.

Para las pruebas de inmunodifusión (ID) se probaron diferentes concentraciones antigénicas (1, 2, 5, 10 y 15 mg/ml) y se encontró que la óptima para esta prueba

.....

ba fué de 2 mg/ml. En la tabla I y II se presenta la reactividad de los antígenos levaduriformes y miceliales a diferentes tiempos de incubación con sueros de pacientes con esporotricosis, histoplasmosis, aspergilosis y neumonías múltiples, además de un suero homólogo hiperinmune de conejo. Al probar sueros de pacientes con esporotricosis, se observó una mayor reactividad con los antígenos obtenidos en la fase estacionaria de crecimiento de ambas formas del hongo, donde se pudieron observar bandas múltiples. Anterior a los 21 días no hubo rendimiento antigénico y por lo tanto no se realizaron pruebas serológicas. Las muestras séricas de pacientes histoplasmosos no mostraron reactividad cruzada, excepto el suero 7 que reaccionó con el antígeno micelial del día 21 con una sola banda. Los sueros de pacientes con neumonías, aspergilosis y sujetos normales no presentaron reactividad.

En contraelectroforesis (CIE) la concentración óptima del antígeno fué de 1 mg/ml. La reactividad en CIE de los antígenos levaduriformes de S. schenckii (Tabla III), al igual que los antígenos miceliales (Tabla IV), mostraron una reactividad similar que en la ID y el número de bandas aumentó de la misma manera que los antígenos obtenidos de la fase estacionaria del hongo en la prueba de ID. Los sueros de pacientes con histoplasmosis y normal no presentaron reactividad cruzada en esta prueba.

Las pruebas cutáneas se realizaron en pacientes sospechosos de esporotricosis e individuos con otras dermatosis de la Unidad de Dermatología del Hospital General de México, S.S. Para ésta prueba sólo se utilizaron dos antígenos: uno micelial (105 días) y otro levaduriforme (30 días), ambos de la fase estacionaria de crecimiento. Los dos antígenos se probaron a una dilución de 1:4000 y 1:2000. La búsqueda del agente etiológico se realizó paralelamente a la prueba intradérmica. Además, en dos pacientes se probó un antígeno de la forma levaduriforme dilución 1:5000, proveniente del Servicio de Micología del Instituto Pasteur, Paris, Francia, que mostró una respuesta similar al nuestro. En la Tabla V se muestra el resultado de estas pruebas intradérmicas en pacientes con esporotricosis y otras dermatosis, donde se puede observar que de 13 pacientes con esporotricosis, 12 respondieron positivamente (92 %) a antígenos de la forma micelial y los 2 pacientes a los cuales se les aplicó antígenos levaduriforme de S. Schenckii. De los 31 pacientes con otras dermatosis a los cuales se les aplicó antígeno micelial

sólo uno reaccionó a la dilución 1:4000, sin embargo, a otros once pacientes a los cuales se les aplicó el antígeno levaduriforme, cuatro (36 %) respondieron positivamente. Debido a que el 36 % de los pacientes con otras dermatosis reaccionaron a la dilución 1:4000 del antígeno levaduriforme, ya no se probó la dilución 1:2000.

.....

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

A pesar del gran número de trabajos sobre antígenos de hongos realizados - hasta la fecha, sólo recientemente se ha logrado conocer la estructura química-fina de algunos componentes antigénicos fúngicos, por ejemplo, las ramnomananas de Sporothrix schenckii (63). Por lo tanto, la estandarización de ellos está - apenas en sus etapas iniciales y se requiere todavía de mucha investigación al respecto.

Huppert (21) ha sugerido que los componentes de los medios de cultivo, pueden producir reactividad inmunológica inespecífica. En la actualidad el uso de estos medios, ha sido sustituido por medios químicamente definidos o semi-sintéticos (21, 33, 51, 60). Por otra parte, algunos investigadores (21, 51) han observado diferencias inmunológicas, entre cepas aisladas de distintas regiones. Con el fin de evitar estas variantes, en este trabajo se utilizaron medios semi-sintéticos (dializados) y cepas aisladas de casos humanos de nuestro país.

Otros factores que afectan la composición y actividad inmunológica de los antígenos fúngicos son: el tiempo de incubación (21, 42, 59) y la morfología - del hongo (21, 41, 51, 55). Karlin y Nielsen (28) al comparar la actividad serológica de antígenos de S. schenckii obtenidos de distintas fases de crecimiento, no observaron diferencias. Takata et al. (59) realizaron un trabajo similar y encontraron que el tiempo de incubación, era una variante que alteró tanto la composición química como la actividad inmunológica. En las curvas de crecimiento realizadas observamos que ambas formas del hongo se comportan de manera similar y que los carbohidratos totales de los antígenos se ve aumentada - progresivamente a medida que transcurre la fase logarítmica, posiblemente originada por la liberación paulatina de componentes de pared celular y solubilización de los mismos en el medio de cultivo (60). Los porcentajes de polisacáridos de las dos formas, permanecieron constantes en la fase estacionaria, pero al finalizar el tiempo de incubación se presentó una disminución, que podría - ser generada por la degradación o consumo de estos productos por el mismo hongo, al haber acabado los nutrientes del medio de cultivo. Por otra parte se pudo establecer que el contenido proteico no varió independientemente de la fase de crecimiento y sólo se presentó un aumento al concluir el lapso de incubación, - probablemente debido a la liberación de componentes intracelulares proteicos. -

.....

El comportamiento antes descrito mostró gran parecido con lo establecido previamente para la forma micelial de S. schenckii por Takata et al (59). Las curvas de crecimiento de las dos formas del hongo obtenidas en este trabajo, nos muestran que la mayoría de los antígenos utilizados tradicionalmente en el diagnóstico de la esporotricosis, son extraídos de la fase estacionaria de crecimiento, por lo que posiblemente se encuentran constituidos de componentes de pared celular, productos metabólicos secretados al medio de cultivo y componentes de autólisis del hongo (16, 37, 40).

Mendoza et al. (41, 64) demostraron que la síntesis de polisacáridos de pared celular depende de la morfología de S. schenckii: en las levaduras y conidias, encuentran principalmente ramnananas de cadenas laterales monoramnosil y en el micelio ramnananas con cadenas laterales diramnosil. La obtención de una u otra forma del hongo es una consecuencia de la disponibilidad de nutrientes y de las condiciones del ambiente (41, 63, 60). Al realizar la purificación de nuestros antígenos por medio de la precipitación por alcohol observamos colateralmente que en cultivos levaduriformes se obtuvieron mezclas morfológicas en la fase estacionaria y que además existen diferencias entre cepas, con respecto a la transformación de la forma micelial a la forma levaduriforme., asimismo en la forma micelial estacionaria, creemos que también existe una heterogenicidad antigénica, por la presencia de conidias al incrementarse el tiempo de incubación.

Lloyd et al. (34) demostraron que los sueros de pacientes con esporotricosis, pueden reaccionar fuertemente con ambas estructuras inmunodominantes de los polisacáridos de S. schenckii y que aparentemente, la reactividad de las estructuras diramnosil estaban relacionadas con la especificidad, por lo tanto él sugiere un paso in vivo de la fase micelial a la forma levaduriforme, lo que ocurre naturalmente en el paciente. En pruebas de precipitación con sueros homólogos, se observó un incremento del número de bandas con los antígenos extraídos de la fase estacionaria, quizás originado por la mezcla de morfologías que existe en esta fase (41, 42, 59). Otro factor que puede influir en la multiplicidad de bandas, puede ser que al realizar la purificación, se precipiten conjuntamente otros componentes de naturaleza polisacáridica (galactonanas o mananas).

La reactividad cruzada de los antígenos de S. schenckii, ha sido demostrada por diversos autores (4, 24, 44, 59) y se ha asociado a los residuos - L - ramno

piranósido que son compartidos por la forma levaduriforme de este hongo y algunas bacterias que forman parte de la flora normal o patógena del hombre. Además ciertos hongos fitopatógenos también pueden presentar esta estructura.

La presencia de reactividad cruzada de sueros de pacientes afectados por -- Histoplasma capsulatum con antígenos de S. schenckii, pudo ser debido a la síntesis de mananas y galactomananas por las células de S. schenckii que se producen -- sobre todo en la etapa temprana de crecimiento (42). Estas estructuras pueden -- ser constituyentes de los componentes inmunológicos de algunas levaduras o formar parte de los antígenos de algunos hongos de micosis profundas como: Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis y Paracoccidioides brasiliensis (2).

El uso de antígenos metabólicos de S. schenckii en pruebas cutáneas aparentemente ha mostrado una alta especificidad (15, 16, 32), sin embargo, algunos investigadores (4, 25) han encontrado reactividad cruzada en pruebas de hipersensibilidad.

Shimonaka et al. (57) ha asociado la fracción peptídica de los glicopéptidos a la respuesta tardía de hipersensibilidad, sin profundizar sus estudios en la -- composición y estructura química del hongo. Takata et al. (59) encuentra que la intensidad de la respuesta de hipersensibilidad tardía en animales de experimentación, estaba relacionada con el contenido proteico. Lavalle (31) al realizar una comparación entre los antígenos de la forma micelial y levaduriforme, observa una mayor sensibilidad en pruebas cutáneas como este último. Ante la imposibilidad -- de probar en este trabajo todos los antígenos obtenidos en un mismo paciente, sólo se probaron dos antígenos de la fase estacionaria, que son los que se utilizan tradicionalmente. Los antígenos que se probaron correspondieron a ambas formas -- de crecimiento: uno micelial y otro levaduriforme. Al realizar la comparación en -- tre ambos tipos de respuesta, observamos que el antígeno levaduriforme mostró una mayor sensibilidad, posiblemente asociada a un mayor contenido proteico. Sin embargo, también mostró un alto porcentaje de positividad en individuos sin la mico -- sis. Puede ser que esta respuesta se asocie a previos contactos inmunosensibilizantes (4, 66) o bien a la similitud con estructuras inmunológicas de otros organismos (25). El tipo de respuesta del antígeno micelial fue muy satisfactorio -- puesto que solo se encontró un porcentaje muy bajo de positividad en individuos --

sin la enfermedad (4%) y correspondió a un individuo con una cicatriz, posiblemente originada por el hongo. Este porcentaje de positividad concuerda con otros - - autores (15, 66).

De acuerdo a nuestros resultados, observamos que el tiempo de incubación fué un factor que influyó en los componentes polisacarídicos de los antígenos, no así el contenido proteico. Por otro lado, se observó que la morfología celular de S. schenckii, es uno de los principales factores que alteran la actividad inmunológica y que la fase de crecimiento se encuentra también relacionada. Además mostramos que los antígenos miceliales tienen una mejor respuesta con respecto a los levaduriformes en pruebas cutáneas. Por lo tanto consideramos que los factores que se deben cuidar en esta elaboración antigénica son: tiempo de incubación, fase de crecimiento, estructura celular predominante y características químicas, - - además de la valoración de las características inmunológicas. Todavía queda mucho por investigarse, sin embargo, para poder llegar a una estandarización de estos antígenos nuestro trabajo propone un modelo experimental que puede llegar a ser de utilidad en la estandarización y la obtención de antígenos fúngicos.

## LISTA DE TABLAS

- Tabla I. Inmunodifusión de antígenos levaduriformes obtenidos de Sporothrix schenckii a diferentes tiempos de incubación.
- Tabla II. Inmunodifusión a antígenos miceliales obtenidos de Sporothrix schenckii a diferentes tiempos de incubación.
- Tabla III. Contraelectroforesis de antígenos levaduriformes obtenidos de Sporothrix schenckii a diferentes tiempos de incubación.
- Tabla IV. Contraelectroforesis de antígenos miceliales obtenidos de Sporothrix schenckii a diferentes tiempos de incubación.
- Tabla V. Pruebas intradérmicas en pacientes con esporotricosis y otras dermatosis.

TABLA I. INMUNODIFUSION DE ANTIGENOS LEVADURIFORMES OBTENIDOS DE SPOROTHRIX SCHENCKII A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION

SUEROS :	ANTIGENOS LEVADURIFORMES OBTENIDOS A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+
3	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+++	+++	+	+	+	+	+	++	++	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se utilizaron sueros previa seleccion de su reactividad positiva en pruebas inmunes

- 1-3 Sueros de pacientes con esporotricosis
- 4-6 Sueros de pacientes con neumonías múltiples
- 7-9 Sueros de pacientes con histoplasmosis
- 10-12 Sueros de pacientes con aspergilosis
- 13 Suero de animal inmunizado con S. schenckii
- 14 Suero de sujeto normal

+ 1 banda                      ++ 2 bandas                      +++ 3 bandas

TABLA II. INMUNODIFUSION DE ANTIGENOS MICELIALES OBTENIDOS DE SPOROTHRIX SCHENCKII A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION

SUEROS	ANTIGENOS MICELIALES OBTENIDOS A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION									
	21	28	35	42	56	63	70	77	105	180
1	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+
2	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
3	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++	++
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	++	+	+	+	++	++	++	++	++	++
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se utilizaron sueros previa selecci3n de su reactividad positiva en pruebas inmunes

- 1-3 Sueros de pacientes con esporotricosis
- 4-6 Sueros de pacientes con neumonías m3ltiples
- 7-9 Sueros de pacientes con histoplasmosis
- 10-12 Sueros de pacientes con aspergilosis
- 13 Sueros de animal inmunizado con S. schenckii
- 14 Suero de sujeto normal

+ 1 banda

++ 2 bandas

+++ 3 bandas

TABLA III. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS DE ANTIGENOS LEVADURIFORMES  
 OBTENIDOS DE SPOROTHRIX SCHENCKII A DIFERENTES TIEMPOS  
 DE INCUBACION

ANTIGENOS LEVADURIFORMES OBTENIDOS A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION										
SUEROS	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se utilizaron sueros previa selección de su reactividad positiva en pruebas inmunes

1-3 Sueros de pacientes con esporotricosis

7 Suero de paciente con histoplasmosis

14 Suero de sujetos normales

+ 1 banda

++ 2 bandas

TABLA IV. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS DE ANTIGENOS MICELIALES OBTENIDOS DE SPOROTHRIX SCHENCKII A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION

ANTIGENOS MICELIALES OBTENIDOS A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION											
SUEROS	21	28	35	42	49	56	63	70	77	105	150
1	+	+	+	++	+++	++	++	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1-3 Sueros de pacientes con esporotricosis

7 Suero de paciente con histoplasmosis

14 Suero de sujeto normal

+ 1 banda

++ 2 bandas

+++ 3 bandas

TABLA V. PRUEBAS INTRADERMICAS EN PACIENTES CON ESPOROTRICOSIS  
Y OTRAS DERMATOSIS

	Antígeno micelial Dil. 1:2000	Antígeno micelial Dil. 1:4000	Antígeno levaduri- forme Dil. 1:4000
Pacientes con esporotricosis	3(3) *	10(9)	2(2)
Pacientes con otras dermatosis	6(0)	25(1)	11(4)

\* número en paréntesis corresponde al número de pruebas intradérmicas positivas.

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Esporotricosis linfangítica
- Fig. 2. Forma micelial de Sporothrix schenckii
- Fig. 3. Forma levaduriforme o parasitaria de Sporothrix schenckii.
- Fig. 4. Estructuras de los polisacáridos de Sporothrix schenckii  
I. Conidias y levaduras II. Micelio. Travassos et al. (63).
- Fig. 5. Obtención de antígenos metabólicos de Sporothrix schenckii.
- Fig. 6. Curva de crecimiento de la fase levaduriforme de Sporothrix schenckii en base al consumo de azúcar.
- Fig. 7. Curva de crecimiento de la fase micelial de Sporothrix schenckii en base al consumo de azúcar.
- Fig. 8. Porcentaje de carbohidratos totales y proteínas en antígenos de la fase levaduriforme de Sporothrix schenckii.
- Fig. 9. Porcentajes de carbohidratos totales y proteínas - en antígenos de la fase micelial de Sporothrix schenckii.

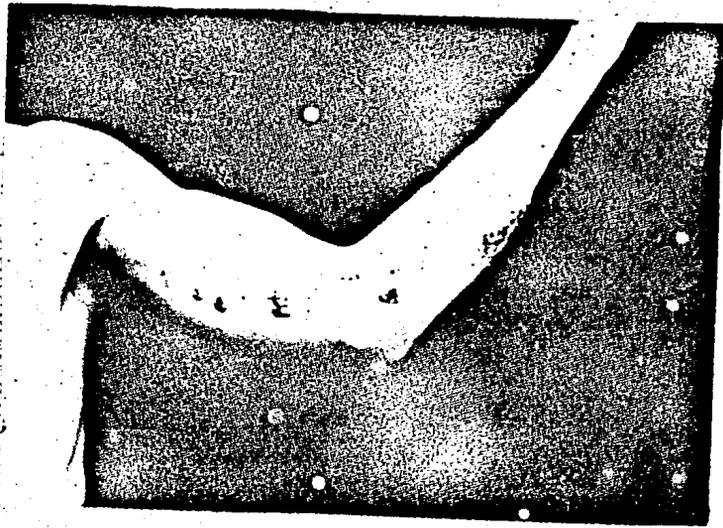


FIG. 1. Esporotricosis [infantica]

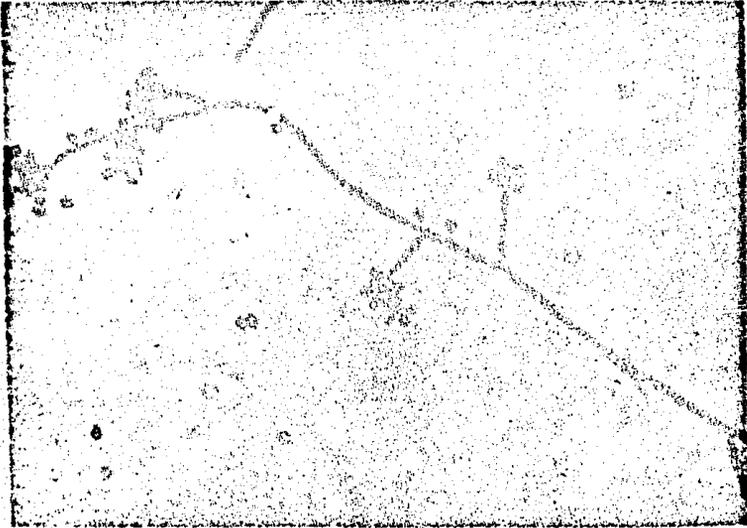
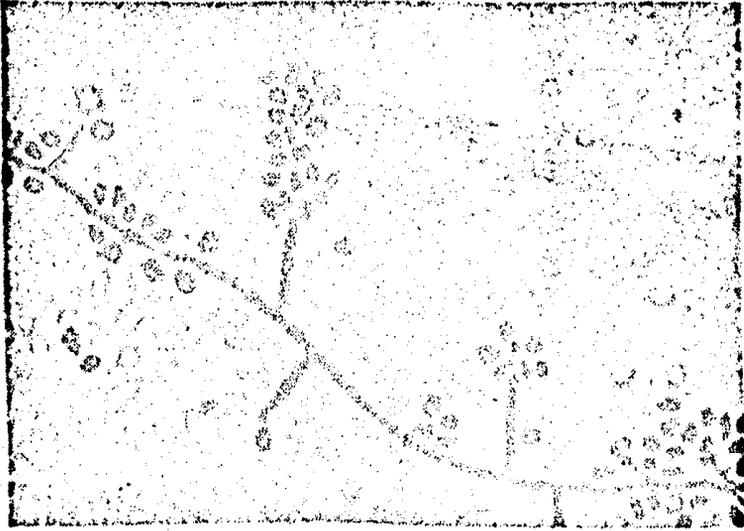


FIG. 2. Forma micelial de Sporothrix schenckii

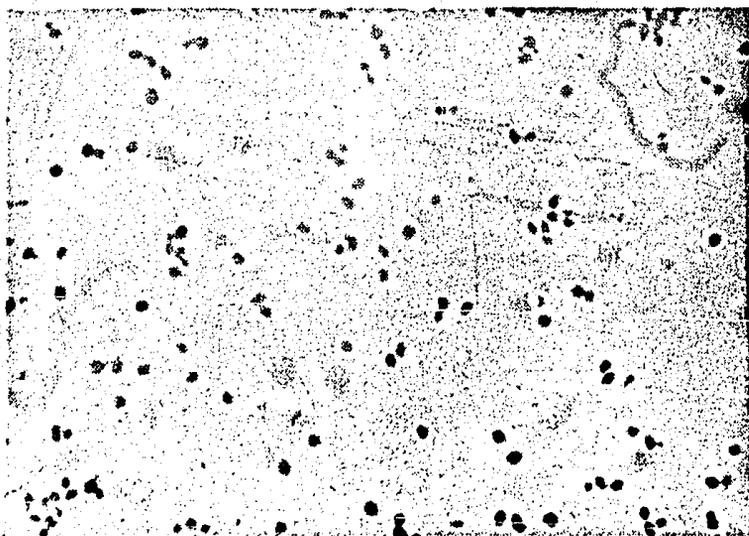
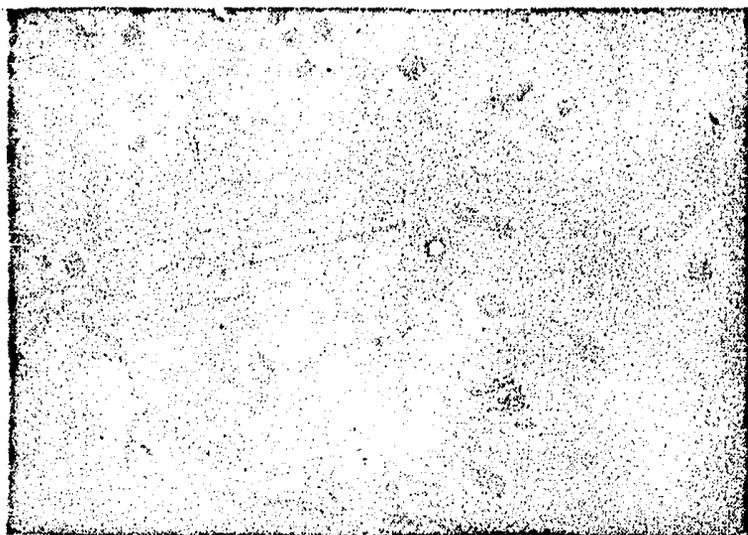


FIG. 3. Forma levaduriforme o parasitaria de Sporothrix schenckii

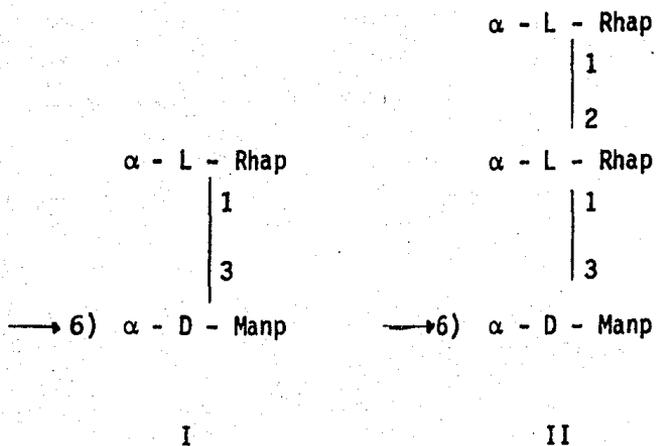


Fig. 4. Estructuras de los polisacáridos de Sporothrix schenckii. Rhap, ramnopirano  
sa; Manp, manopiranosá. I. Conidias y levaduras. II. Micelio. Travassos et  
al. (83).

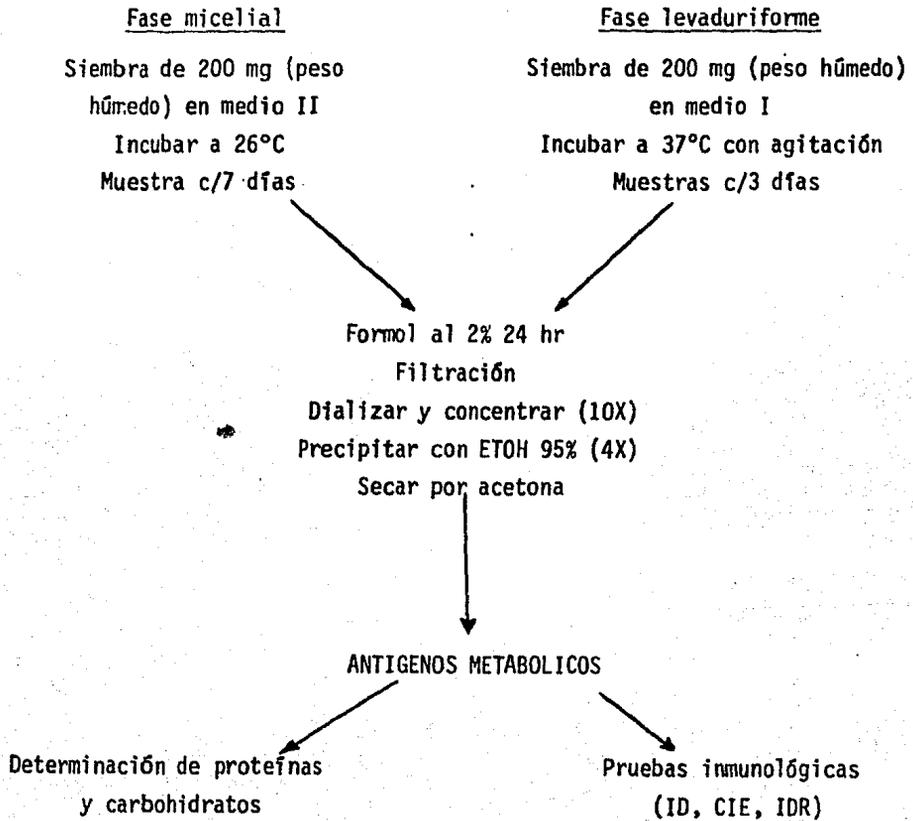


Fig. 5. Obtención de antígenos metabólicos de Sporothrix schenckii.

ID = Inmunodifusión

CIE = Contraímuno-electroforesis

IDR = Intradermo reacción

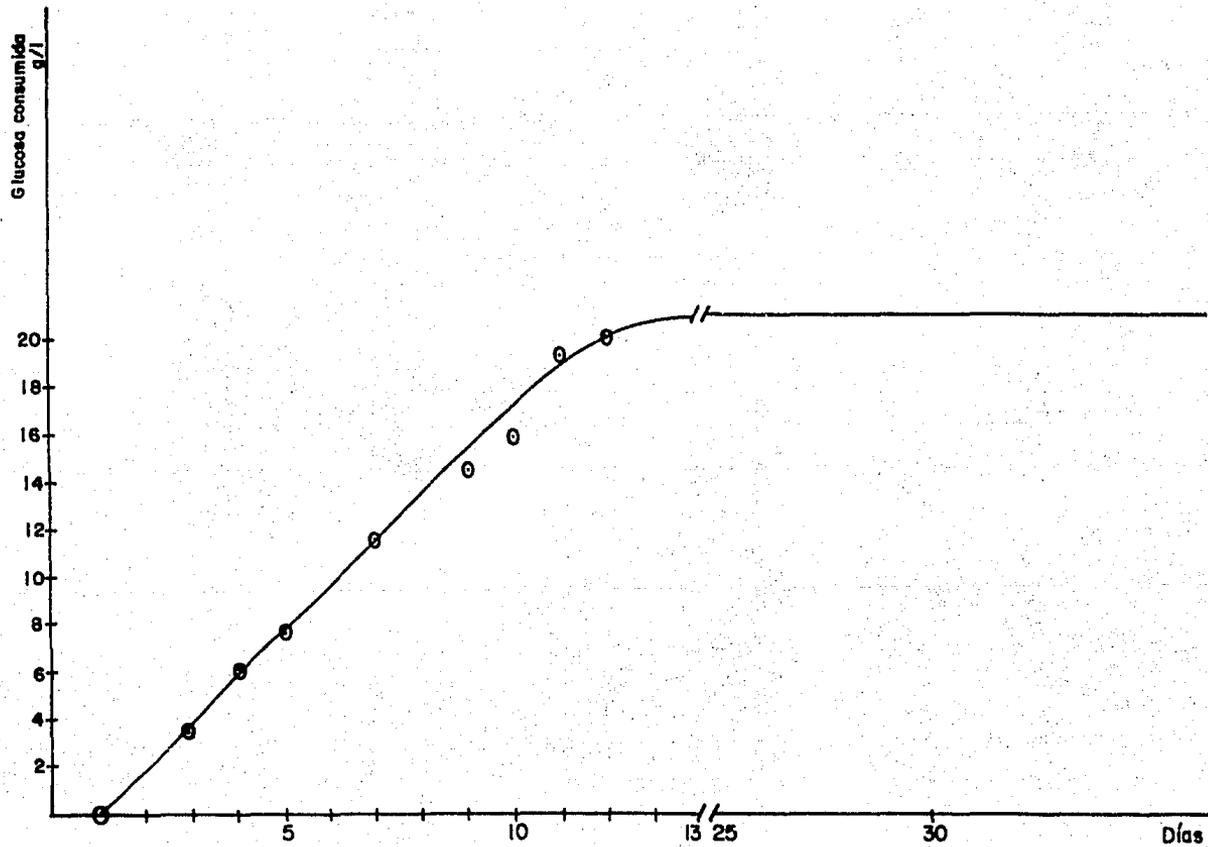


Fig. 6. Curva de crecimiento de la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii* en base al consumo de glucosa.

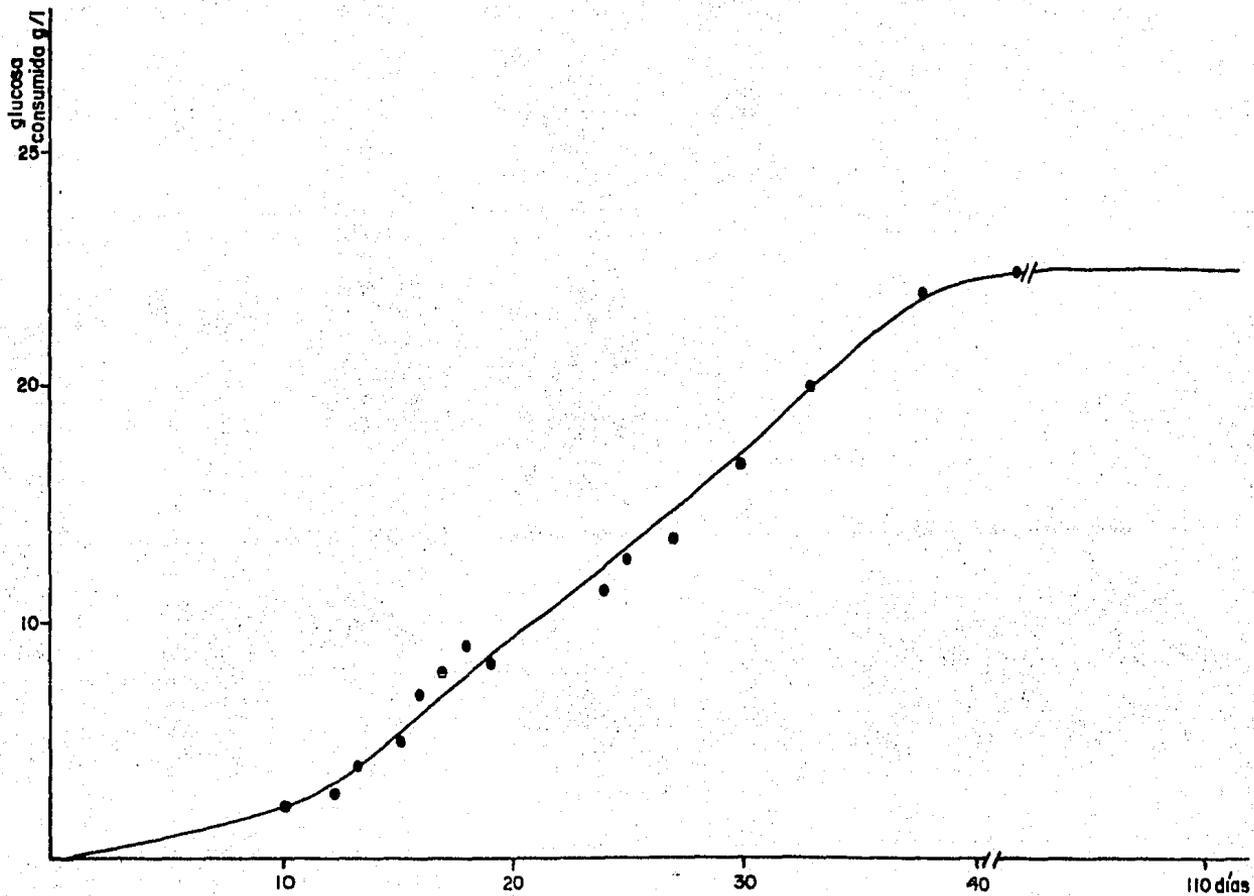


Fig.7. Curva de crecimiento de la fase micelial de *Sporothrix schenckii* en base al consumo de glucosa.

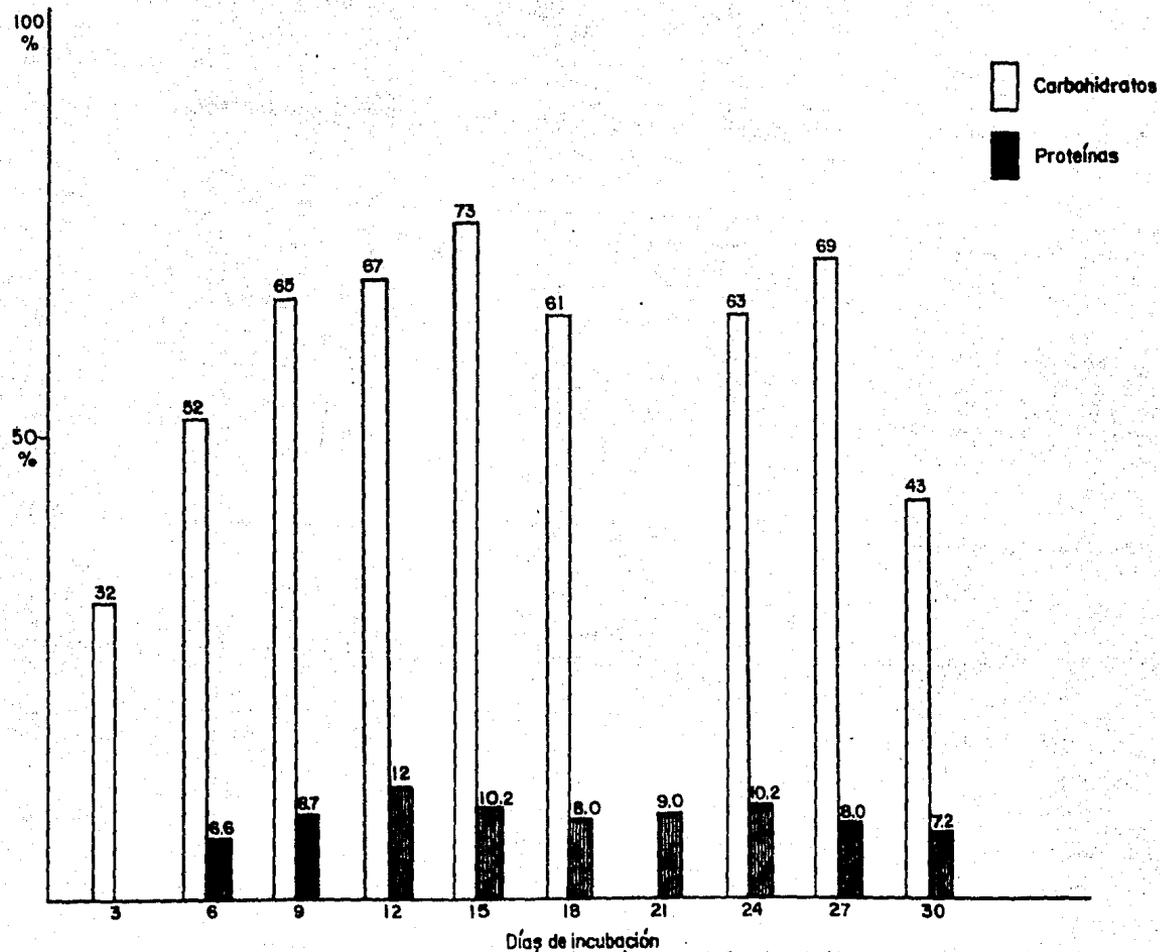


Fig. 8 Porcentaje de carbohidratos totales y proteínas en antígenos de la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii*

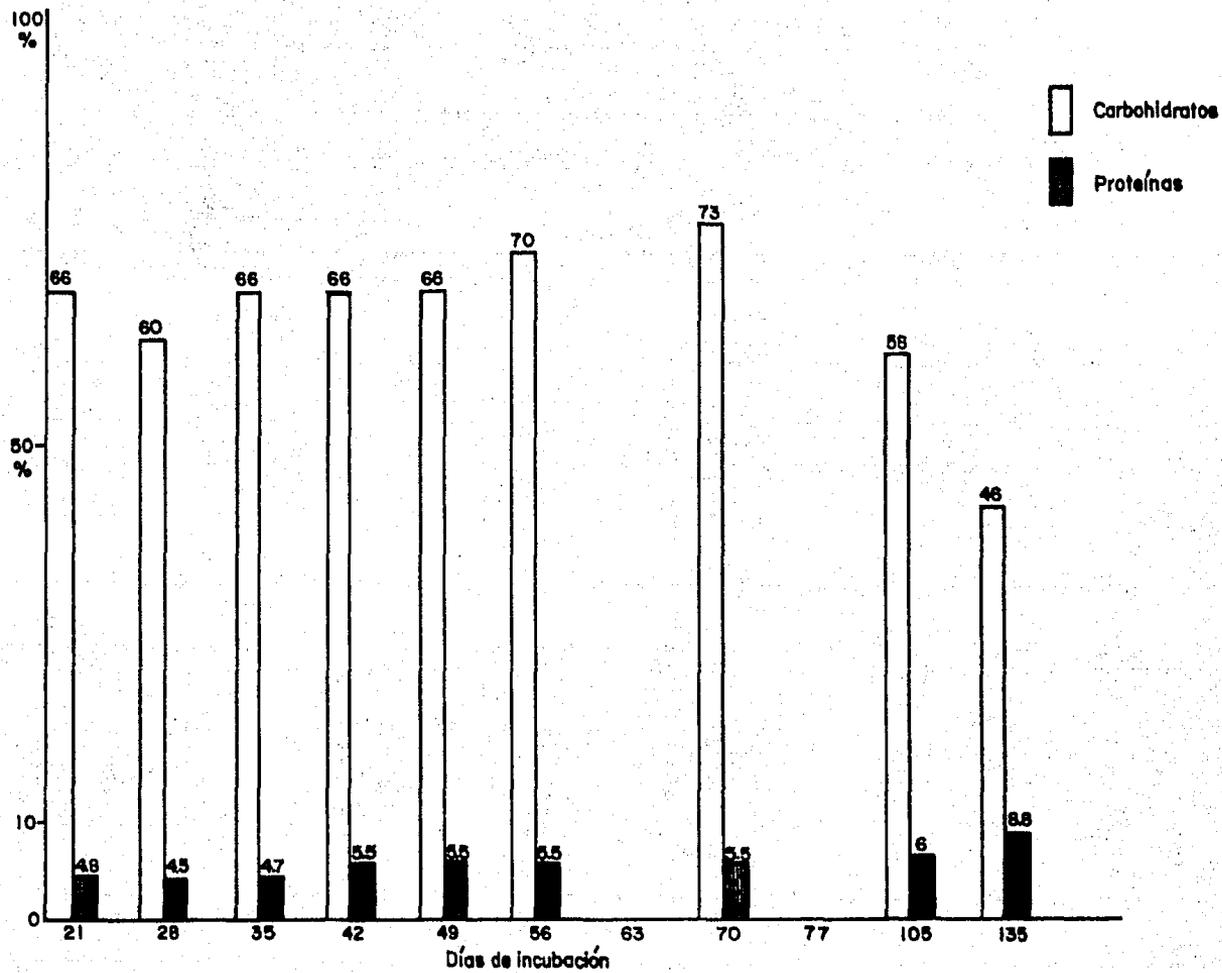


Fig.9 Porcentaje de carbohidratos totales y proteínas en antígeno de la fase micelial de *Sporothrix schenckii*

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

- 1.- Albornoz, M.B., Villanueva, E. & Torres, E. 1978. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. *Mycopathologia*, 85:177-183.
- 2.- Azuma, I., Kanetsuna, F., Tanaka, Y., Yamamura, Y. & Carbonell, L. 1974. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from - - Histoplasma duboisii, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis and Blastomyces dermatitidis. *Mycopathologia*, 54: 111-125.
- 3.- Bach, J.P. 1984. *Inmunología*. Ed. Limusa, México.
- 4.- Becerril, M., Acosta, G., Casasola, J., Rehora Gutiérrez, F., Díaz Gómez, M.L., Velasco Castrejón, O., Taylor, M.L. & Toriello, C. 1985. Investigación de la respuesta inmune a antígenos fúngicos en pacientes de un hospital de enfermedades respiratorias. *Rev. Mex. Mic.*, 1:211-226.
- 5.- Bievre, C. de & Mariat, F. 1981. Les différentes fractions polysidiques de Sporothrix schenckii. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 132 B: 123-126.
- 6.- Castro, R.M., Flores de Sobogal, M., Cuce, L.C. & Salebien, A. 1980. - - Disseminate sporotrichosis. Report of a clinical case with mucocutaneous, osteo-articular and ocular lesions. *Mycosen*, 24: 137-146.
- 7.- Contí-Díaz, I. 1981. La esporotricosis en el Uruguay. Aspectos epidemiológicos y clínicos. *An. Fac. Med. Montevideo*, 2a. época, 4: 137-146.
- 8.- Dawes, R.A., McGill, D.J. & Midley, M. 1971. Determination of Glucose.  
In: *Methods in Microbiology*. Norris, J.R. & Ribbons, D.W. (Eds.) Vol. 6 Academic Press, Londres.
- 9.- Cox, R.A. 1983. Cell-mediated immunity. In: *Fungi pathogenic for human and animals*, Vol. 3 Howard, D.H. (Ed.), Marcel Dekker, Nueva York.
- 10.- Diamond, R.D. 1983. Humoral responses of the host. In: *Fungi pathogenic for human and animals*. Vol. 3 Howard, D.H. (Ed.), Marcel Dekker, Nueva York.

- 11.- Dubois, M., Giles, K., Hamilton, K., Reber, P.A. & Smith, F. 1951. A - - colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168: 167.
- 12.- Emmons, W.C., Chapman, H.B., Utz, L.P. & Kwon-Chung, K.J. 1977. *Medical - Mycology*. Lea & Febiger, 3 ed. Philadelphia.
- 13.- Fudenberg, H.M., Stites, D., Stobo, J.D. & Wells, J.V. 1985. *Inmunología básica y clínica. El manual moderno*, 5 ed. México.
- 14.- González Ochoa, A., Féliz, D. & Anaya, D. 1976. Immunofluorescence in - sporotrichosis. *Dermat. Ib. Lat. Am.* 2: 77-82.
- 15.- González Ochoa, A., Ricoy, E., Velasco, O., López, R. & Navarrete, F.- - 1970. Valoración comparativa de los antígenos polisacárido y celular de Sporothrix schenckii. *Rev. Inv. Salud. Pública (México)*, 30: 303-315.
- 16.- González Ochoa, A. & Soto Figueroa, E. 1947. Polisacáridos de Sporotrichum schenckii. Datos inmunológicos. Intradermo-reacción en el diagnóstico de la esporotricosis. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. Méx.*, 8: 143-153.
- 17.- Gorin, P.A.J. & Haskins, R.H. 1977. Further studies in the rhamnomannans and acidic rhamnomannans of Sporothrix schenckii and Ceratocystis stenoceras. *Carbohydr. Res.* 55: 21-33.
- 18.- Gorin, P.A.J. & Spencer, J.F.T. 1968. Structural chemistry of fungal - - polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Res.*, 23: 367-417.
- 19.- Harada, Y., Nishikawa, T. & Hatano, H. 1976. Antigenic similarity between Ceratocystis species and Sporothrix schenckii as observed by immunofluorescence. *Sabouraudia*, 14: 211-214.
- 20.- Hearn, V.M. & Mackenzie, D.W.R. 1980. The preparation and partial purification of fractions from mycelial fungi with antigenic activity. *Molecular - Immunology* 17: 1097-1103.
- 21.- Huppert, M. 1983. Antigens used for measuring immunological reactivity. In: *Fungi pathogenic for human and animals*. Vol. 3 Howard, D.H. (Ed.), Marcel-Decker, Nueva York.

.....

- 22.- Huppert, M., Spratt, N.S., Vucivich, K.R. & Sun, S.H. 1978. Antigenic - analysis of coccidioidin and spherulin determined by two-dimensional - - immunoelectrophoresis. *Infect. Immun.* 20: 541-551.
- 23.- Huppert, M., Adler, J.P. & Rice, E.H. 1978. Common antigens among systemic disease fungi analysed by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Infect. Immun.*, 23: 479-485.
- 24.- Ishizaki, H., Nakamura, Y. & Hasegawa, A. 1983. Low-titer agglutinins to Sporothrix schenckii in nonsporotrichotic humans and animal sera. *J. - - Dermatol.*, 10: 501-504.
- 25.- Ishizaki, H., Nakamura, Y., Kariya, H., Iwatsu, T. & Wheat, R. 1976. - - Delayed hypersensitivity cross-reactions between Sporothrix schenckii and Ceratocystis species in sporotrichotic patients. *J. Clin. Microbiol.* 3: 545-547.
- 26.- Ishizaki, H., Wheat, R.W., Kiel, D.P. & Connant, N.F. 1978. Serological-cross reactivity among Sporothrix schenckii, Ceratocystis, Europhium and Graphium species. *Infect. Immun.* 21: 585-593.
- 27.- Kabat, E.A. 1964. *Inmunoquímica experimental*. La Prensa Médica Mexicana, 1 ed. México.
- 28.- Karlin, J.V. & Nielsen, H.S. 1970. Serologic aspects of sporotrichosis.- *J. Infect. Dis.*, 121: 316-327.
- 29.- Kobayashi, G. & Newmark, N.L. 1969. Pulmonary sporotrichosis. *J.A.M.A.*, - 210: 1741-1744.
- 30.- Kite, J.H. 1979. Immunology of mycotic diseases. In: Principles of - - Immunology. Rose, N.R., Milgrom, F. & Van OSS, C.J. (Eds.) 2a. ed. - - McMillan Publishing Co. Nueva York.
- 31.- Lavalle, P. 1978. Aspectos clínicos, inmunológicos y epidemiológicos de la esporotricosis. *Memorias IV Cong. Mex. Dermatol. Tamps. México.*

- 32.- Lavalle, P. 1979. Esporotricosis. Simposio Syntex: Desarrollo y estado actual de la Micología en México. Ediciones del Instituto Syntex, México D.F. pp 115-138.
- 33.- Lloyd, K.O. & Bitton, M.A. 1971. Isolation and purification of peptido-rhamnonnans from the yeast form of Sporothrix schenckii. Structural and immunochemical studies. J. Immunol., 107: 663-671.
- 34.- Lloyd, K.O. & Travassos, L.R. 1975. Immunochemical studies on L-rhamno-D-mannans of Sporothrix schenckii and related fungi by use of rabbit and human antisera. Carbohydr. Res. 40: 89-97.
- 35.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein-measurement with folin phenol reagent J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- 36.- Lynch, P.J., Voorhees, J.J. & Harnell, E.R. 1971. Systemic sporotrichosis. Ann. Inter. Med. 73: 23-30.
- 37.- Mackenzie, D.W.R. 1983. Serodiagnosis. In: Fungi Pathogenic for human and animals Vol. 3 Howard D.H. (Ed.) Marcel Dekker, Nueva York.
- 38.- Mariat, F. 1971. Adaptation de Ceratocystis stenoceras (Robak) C. Moreau a la vie parasitaire chez l'animal. Etude de la souche sauvage et des mutants pathogènes. Comparaison avec Sporothrix schenckii Hektoen et Perkins. Rev. Mycol. 36: 3-24.
- 39.- Mariat, F. 1975. Observations sur l'écologie de Sporothrix schenckii et de Ceratocystis stenoceras en Corse et en Alsace. Provinces indemnes de sporotrichose. Sabouraudia, 13: 217-225.
- 40.- Mayorga, R., Cáceres, A., Toniello, C., Gutiérrez, G., Alvarez, O., Ramírez, M.E. & Mariat, F. 1978. Etude d'endemie sporotrichosique au Guatemala. Sabouraudia, 16: 185-198.
- 41.- Mendoca, L., Gorin, P.A.J., Lloyd, K.O. & Travassos, L.R. 1976. Polymorphism of Sporothrix schenckii surface polysaccharides as function of morphological differentiation. Biochemistry, 15: 2423-2431.

- 42.- Mendoca Previato, D., Gorin, P.A.J. & Travassos, L.R. 1980. Galactose containing polysaccharides from human pathogens Sporothrix schenckii- and Ceraticystis stenoceras. Infect, Immun., 29: 934-939.
- 43.- Mohr, J.A., Griffiths, W. & Long, H. 1979. Pulmonary sporotrichosis in Oklahoma and susceptibilities in vitro. Am. Rev. Resp. Dis., 119: 961-964.
- 44.- Nakamura, Y., Ishizaki, H. & Wheat, R.W. 1977. Serological cross reactivity between group B Streptococcus, Sporothrix schenckii, Ceraticystis and Graphium species. Infect. Immun. 16: 547-549.
- 45.- Nan Scott, B., Muchmore, H.G. & Parkinson, A.J. 1982. Enzyme and immunoassays in human sporotrichosis. In: Baxter, M. (Ed.) Proceedings of the VIIIth. Congress of International Society for Human and Animal Mycology, Palmerston North, Nueva Zelanda, 8-12 feb. Nueva Zelanda, Massey University, 212-215.
- 46.- Nielsen, H.S. 1968. Biological properties of skin test antigens of yeast from Sporotrichum schenckii. J. Infect. Dis., 139: 152-157.
- 47.- Ouchterlony, O. 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy, 6: 30.
- 48.- Pepsy, J. & Longbottom, J.L. 1978. Immunological methods in Mycology. In: Handbook of experimental immunology Weir, H.M. (Ed.) 3a. ed. Blackwell--Scientific Publications, Londres.
- 50.- Plouffe, F.J., Silva, J., Fekety, R., Reinhalter, E. & Browne, E. 1979.- - Cell mediated immune response in sporotrichosis. J. Infect. Dis., 139: 152-157.
- 51.- Restrepo, A., Cano, L.E. & Ochoa, M.T. 1978. A yeast-derived antigen from Paracoccidioides brasiliensis useful for serologic testing. Sabouraudia, 22: 23-29.
- 52.- Rippon, J.W. 1974. Medical Mycology. W.B. Saunders Company, Filadelfia.
- 53.- Rohatgi, P.K. 1980. Pulmonary sporotrichosis. South. Med. J., 73: 1611-1618.

- 54.- Russell, B., Beckett, J.H. & Jacobs, P.H. 1979. Immunoperoxidase localization of Sporothrix schenckii and Cryptococcus neoformans. Arch. Dermatol., 115: 433-435.
- 55.- San Blas, G. 1982. The cell wall of fungal human pathogens: Its possible - role in host-parasite relationships. Mycopathologia, 79: 159-184.
- 56.- Schneidau, J.D., Lamar, L.M. & Hairston, M.A. 1964. Cutaneous hipersensitivity in Louisiana. J.A.M.A., 188: 371-373.
- 57.- Shimonaka, H., Noguchi, T., Kawai, K., Hasegawa, I., Nozawa, Y. & Ito, Y. 1975. Immunochemical studies on the human pathogens Sporothrix schenckii: Effects of chemical and enzymatic modifications of the antigenic compounds upon immediate and delayed reactions. Infect. Immun., 11: 1187-1194.
- 58.- Steele, R., Cannady, P.B., Moore, W.L. & Gentry, L. 1976. Skin test and blastogenic responses to Sporotrichum schenckii. J. Clin. Invest. 57: 156-160.
- 59.- Takata, M. & Ishizaki, H. 1983. Correlations among culture times, sugar composition and biological activities of Sporothrix schenckii antigens. Mycopathologia, 84: 31-39.
- 60.- Toriello, C. & Mariat, F. 1974. Etude comparée des polysides des - - - champignons Ceratocystis stenoceras et Sporothrix schenckii. Composition chimique et analyse immunologique. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 125A: 287-307.
- 61.- Travassos, L.R., Gorin, P.A.J. & Lloyd, K.O. 1973. Comparaison of - - - rhamnomannans from human pathogens Sporothrix schenckii with those from the Ceratocystis species. Infect. Immun., 8: 685-693.
- 62.- Travassos, L.R., Gorin, P.A.J. & Lloyd, K.O. 1974. Discrimination between Sporothrix schenckii and Ceratocystis stenoceras rhamnomannans by proton and carbon-13 magnetic resonance spectroscopy. Infect. Immun., 9: 674-680.
- 63.- Travassos, L.R. & Lloyd, K.O. 1980. Sporothrix schenckii and related - - species of Ceratocystis. Microbiol. Rev. 44: 683-721.

- 64.- Travassos, L.R., Mendoca-Previato, L. & Gorin, P.A.J. 1978. Heterogeneity of rhamnomannans from one strain of the human pathogen Sporothrix schenckii determined by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Infect. Immun.* 19: 1107-1109.
- 65.- Travassos, L.R. & Mendoca-Previato, L. 1978. Synthesis of monorhamnosyl L-rhamno-D-mannans by conidia of Sporothrix schenckii. *Infect. Immun.*, 19: 1-4.
- 66.- Velasco, O., & González Ochoa, A. 1971. Esporotricosis en individuos con esporotricina reacción positiva previa. *Rev. Inv. Salub. Pública (México)*, 31: 53-55.
- 67.- Velasco, O. & González Ochoa, A. 1976. La esporotricosis en un pequeño poblado de Puebla. *Rev. Inv. Salub. Pública (México)*, 36: 133-137.