

INVESTIGACION DE LA RESPUESTA INMUNE A ANTIGENOS  
FUNGICOS EN PACIENTES DE UN HOSPITAL DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

por: *Martín Becerril, \**  
*Gustavo Acosta, \*\**  
*Jesús Casasola, \**  
*Fernando Reborá Gutiérrez, \*\*\**  
*María Luisa Díaz Gómez, \*\*\**  
*Oscar Velasco Castrejón, \*\*\*\**  
*María Lucía Taylor\* y*  
*Conchita Toriello\**

RESEARCH OF THE IMMUNE RESPONSE TO FUNGAL ANTIGENS  
FROM PATIENTS OF A RESPIRATORY DISEASE HOSPITAL

In order to amplify the knowledge of systemic mycosis in Mexico, and characterize the possible associations with pulmonary disease, different immunological tests (precipitation, complement fixation, ELISA, skin test) were performed in 98 patients from different regions of the Mexican Republic hospitalized in a National Institute of Respiratory Diseases (which concentrates patients from the Mexican Republic), where 95% of the patients had chronic tuberculosis. Seven crude fungal antigens (histoplasmin, blastomycin, coccidioidin, paracoccidioidin, candidin, sporotrichin and aspergillin) and 3 purified antigens (deproteinized polysaccharide protein complexes,

---

\* Depto. de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M., México, D.F., 04510.

\*\* Lab. Inmunoquímica, Escuela de Medicina, I.P.N., México, D.F., 11340.

\*\*\* Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, S.S. México, D.F., 14080.

\*\*\*\* Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, S.S., México, D.F., 11340.

D-PPC): D-PCC-histo, D-PPC-cocci, and D-DPPC-paracocci were tested. The results indicated an immunosensitizing contact between patients and fungi and a greater reactivity of crude antigens than purified antigens was observed in the immunological tests used.

### RESUMEN

Con el fin de ampliar el conocimiento del estado actual de las micosis profundas en México y caracterizar posibles asociaciones en padecimientos pulmonares o profundos, se realizaron diferentes pruebas inmunológicas (precipitación, fijación de complemento, ELISA, intradermorreacción) en 98 pacientes provenientes de distintas regiones de México hospitalizados en un sanatorio de enfermedades respiratorias (que concentra pacientes de toda la República Mexicana) donde el 95% de los pacientes padecían de tuberculosis crónica. Se probaron 7 antígenos fúngicos crudos (histoplasmina, blastomicina, coccidioidina, candidina, esporotricina y aspergilina) y 3 antígenos purificados (complejos polisacáridos-proteína desproteinizado CPP-D): CPP-D-histo, CPP-D-cocci, y CPP-D-paracocci. Los resultados indicaron un contacto inmunosensibilizante de los pacientes con los hongos y una mayor respuesta de los antígenos crudos que los purificados en las pruebas inmunológicas utilizadas.

### INTRODUCCION

Desde que González Ochoa (1960) y Carrada (1962) realizaron un estudio de pacientes de diferentes hospitales de México para ver su respuesta a antígenos fúngicos, no se había vuelto a investigar sobre la incidencia de las micosis profundas en pacientes de enfermedades respiratorias. Teniendo en cuenta que la histoplasmosis es ya considerada en México una micosis importante en la salud pública (Velasco, 1985), además de que existen zonas endémicas de coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis en el país (Velasco, 1981; González Ochoa, 1967) y tomando en cuenta el frecuente diagnóstico de candidosis en centros hospitalarios, se consideró importante realizar el presente trabajo en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) que concentra pacientes de toda la República Mexicana. Debido al hecho de que en nuestro laboratorio se obtienen antígenos para el diagnóstico y pronóstico de las micosis profundas y oportunistas (Toriello *et al.*, 1982), nos pareció importante probar la reactividad y especificidad de antígenos crudos y purificados en diferentes pruebas inmunológicas en una población de pacientes con enfermedades respiratorias, con el fin de caracterizar posi-

bles asociaciones o antecedentes de enfermedades micóticas, ya que muchas veces éstos pacientes desarrollan infecciones concomitantes que dificultan la resolución del padecimiento.

### MATERIALES Y METODOS

**POBLACION ESTUDIADA:** El estudio fue realizado en 98 pacientes del INER, a los cuales se les tomó 10 ml de sangre para obtener el suero y se les aplicó la intradermorreacción al día siguiente. Las características de los pacientes vienen descritas en la tabla 1.

**HONGOS:** Para obtener los antígenos se utilizaron cepas de hongos aislados de casos humanos: *Histoplasma capsulatum* (cepa León Pérez), *Paracoccidioides brasiliensis* (ISET-5508), *Coccidioides immitis* (ISET-5221), *Blastomyces dermatitidis* (ISET-5005), *Aspergillus fumigatus* (EH-20), *Sporothrix schenckii* (CDP-705-78) y *Candida albicans* (EH-21). Las cepas fueron mantenidas en agar de Sabouraud a 26°C en el laboratorio.

**ANTIGENOS:** Se obtuvieron 7 antígenos crudos y 3 purificados. Las histoplasmina, blastomicina, paracoccidioidina y coccidioidina fueron obtenidas del cultivo en medio de Smith con asparagina después de 3-4 meses de incubación a 26°C. Cada filtrado fue 10 veces concentrado de su volumen inicial, obteniéndose así los antígenos crudos mencionados. Las histoplasmina, paracoccidioidina y coccidioidina fueron purificadas posteriormente por medio de la técnica de Kirby (1956) modificada por Taylor (1977). A 10 ml de filtrado concentrado se le agregaron 10 grs de fenol líquido. Se separó la fase acuosa, la cual fue precipitada por etanol al 95%. Este precipitado fue posteriormente desproteinizado por pronasa al 1%, 37°C, durante 7 días (Taylor, 1977; Sevag, 1934), obteniendo así los antígenos purificados denominados complejos polisacárido-proteína desproteinizados (CPP-D) de *H. capsulatum* (CPP-D-histo), *P. brasiliensis* (CPP-D-paracocci) y *C. immitis* (CPP-D-cocci).

La aspergilina fue obtenida del filtrado del cultivo de *A. fumigatus* con 1 mes de incubación a 26°C en medio de Czapek modificado (dextrosa en lugar de sacarosa). El filtrado fue dializado y concentrado 10 veces y precipitado posteriormente por acetona en frío. La esporotricina fue obtenida del filtrado del cultivo de 3 meses de incubación de *S. schenckii* a 26°C en medio sintético de Mariat (Toriello y Mariat, 1974). El filtrado también fue dializado y concentrado para su posterior precipitación por alcohol (3X) y secado por acetona en frío.

La candidina fue obtenida de levaduras cultivadas a 37°C, en medio semisintético constituido por: dializado de extracto de levadura 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g, KCL 0.5 g,  $\text{FESO}_4$  0.01 g,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g, y glucosa 30 g, c.b.p. 1000 ml. Después de 48 horas de incubación, las células fueron muertas con formol al 0.5% y lavadas tres veces con solución salina. Las levaduras se rompieron por medio del fraccionador RIBI a 40,000 psi, 7 veces por 5 segundos. Se procedió a una centrifugación (250Xg) para eliminar el debris celular y el sobrenadante fue utilizado como antígeno. A todos los antígenos utilizados se les determinó proteína (según Lowry, 1951) y carbohidrato (según Morris, 1948).

#### INTRADERMORREACCION (IDR)

Para la prueba intradérmica, se regularizaron los antígenos en reactores conocidos aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  proteína/0.1 ml de solución salina isotónica estéril. Solamente la esporotricina fue utilizada a una dilución de 1/2000 que corresponde a 3.5  $\mu\text{g}$  proteína/0.1 ml. La prueba se realizó aplicando 0.1 ml intradérmicamente en la cara interna del antebrazo. Se leyó a las 24 y 48 horas, considerándose positiva la reacción con eritema e induración mayor de 5 mm de diámetro.

#### PRUEBAS SEROLOGICAS

El suero separado de cada paciente fué distribuido en alícuotas y almacenado en congelación con azida de sodio como conservador.

La inmunodifusión (ID) se desarrolló según la técnica de Ouchterlony (1978) con una solución amortiguadora de glicina (7.5% glicina, 0.9% NaCl y 0.1% azida de sodio) con 1% de agarosa. La contrainmunolectroforesis (CIE) se llevó a cabo utilizando solución amortiguadora de veronal pH 8.2 con 1% de agarosa y una corriente de 1 mA por placa durante 1 hora. La reacción de fijación de complemento (RFC) se realizó según la técnica del 50% de hemólisis (Manual OPS, OMS, 1975) y finalmente para la prueba de ELISA (Ensayo inmunoenzimático), se procedió según la técnica de Voller *et al.* (1979) utilizando un conjugado anti-IgG anti-IgM marcado con fosfatasa alcalina (Cordis-USA) estimada por absorbancia a 405 nm, corrigiendo los valores con la absorbancia no específica de sueros normales. Esta técnica sólo fue llevada a cabo en los sueros que presentaron reacción positiva a las pruebas de inmunodifusión y contrainmunolectroforesis para comparar la reactividad y sensibilidad de los antígenos crudos y purificados.

#### ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó con tablas de contingencia para calcular la significancia (P) por medio de  $\chi^2$

#### RESULTADOS

La población de pacientes estudiada procedió en su mayoría del pabellón 5 del Instituto de Enfermedades Respiratorias, constituida totalmente de mujeres entre 17 y 75 años de edad y de las cuales el 75.7% padecían de otras enfermedades respiratorias (Tabla 1). Tomando en cuenta la división de la República Mexicana en doce regiones de mayor a menor marginación de la población según el IMSS-COPLAMAR (Tabla 2), se puede observar que la mayoría de los individuos provenían de la zona centro del país (Estados de México y Morelos: 27.55%) y del Distrito Federal (20.4%). Por otro lado, es importante destacar la ausencia de enfermos provenientes de las zonas sureste y pacífico norte. Con respecto a la edad de los pacientes, que oscilaba en un rango de 17 a 75 años, se encontró que el 92% de los casos que resultaron positivos a las pruebas intradérmicas realizadas, correspondían a individuos de menos de 60 años y un 7.47% a mayores de 60 años (Tabla 3).

La aplicación de la prueba intradérmica (IDR) con los 7 antígenos en la población estudiada, mostró que el mayor número de reactores positivos a éstos antígenos fúngicos provenían de los estados de México, Morelos y D.F. (Fig. 1), lo que corresponde asimismo al mayor número de pacientes de esta zona (Tabla 2). En la fig. 1 podemos observar una reactividad a la IDR del 1% a la histoplasmina en la región Centro, 8.1% a la coccidioidina en las regiones del Golfo Centro y D.F.; 11.2% a la paracoccidioidina en las regiones del Golfo Centro; 12.2% a la blastomicina en las regiones del Centro, D.F., Golfo Centro, Centro Este, Pacífico Centro; 5.1% a la esporotricina en las regiones Centro, D.F., Golfo Centro, Pacífico Centro; 17.3% a la candidina de las regiones del Centro, D.F., Golfo Centro, Centro Este, Pacífico Sur, Pacífico Centro, Norte; y por último 5.1% a la aspergилina en las regiones del Centro, Centro Este, Pacífico Sur y Pacífico Centro.

En la Tabla 4 se puede observar el resultado de las pruebas de inmunodifusión en gel (ID) y contrainmunolectroforesis (CIE). La mayor reactividad la encontramos con el antígeno de paracoccidioidina, tanto en ID como en CIE. La blastomicina fue negativa para todos los pacientes en ID, sin embargo, se encontró un 28.5% de reactividad en CIE.

Teniendo en cuenta que el 12% de las pacientes estudiadas presentaban tu-

TABLA 1

## POBLACION ESTUDIADA

NUMERO:	98 pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.	
EDAD:	17 - 75 años.	
SEXO:	Femenino	
DIAGNOSTICO:	Tuberculosis	75.5 %
	Tuberculosis y diabetes	12.0 %
	Otras enfermedades respiratorias.	12.3 %

berculosis y diabetes y ésta última afección es un factor predisponente en la adquisición de micosis oportunistas, se trató de relacionar los resultados de las pruebas realizadas en estas pacientes con asociaciones micóticas y se encontró en tres de ellas una probable asociación con candidosis ya que presentaron positividad en las pruebas de fijación de complemento, contrainmuno-electroforesis y a la intradermorreacción con el antígeno candidina (Tabla 5).

Para tratar de encontrar una correlación entre las distintas pruebas inmunológicas utilizadas, se realizó un análisis estadístico por  $\chi^2$  y se encontró que al correlacionar las pruebas de IDR e ID no había correlación ( $P > 0.05$ ) para cada uno de los antígenos. Por otro lado al analizar la IDR con la CIE utilizando el antígeno coccidioidina, se encontró una correlación ( $p < 0.05$ ) la misma que se detectó con la candidina al correlacionar la IDR con la RFC ( $p < 0.05$ ) (Tabla 6). Sin embargo, con los otros antígenos estudiados no se logró observar ninguna correlación ( $p > 0.05$ ).

Para valorar la utilidad de los antígenos purificados frente a los antígenos crudos, éstos fueron confrontados en pruebas de inmunodifusión, contrainmuno-electroforesis y ELISA.

TABLA 2  
PROCEDENCIA DE LOS PACIENTES EN LA REPUBLICA MEXICANA\*

REGIONES	%	REGIONES	%
Pacífico Sur Chiapas Guerrero Oaxaca	17.3	Pacífico Centro Durango Nayarit Sinaloa	2.04
Centro Este Hidalgo Puebla Tlaxcala	10.2	Centro México Morelos	27.55
Centro Norte San Luis Potosí Zacatecas	1.02	Occidente Aguascalientes Colima Jalisco	1.02
Centro Occidente Guanajuato Michoacán Querétaro	1.02	Norte Coahuila Chihuahua Nuevo León Tamaulipas	2.04
Sureste Campeche Quintana Roo Yucatán	0	Pacífico Norte Baja California Norte Baja California Sur Sonora	0
Golfo Centro Tabasco Veracruz	14.2	Distrito Federal Ciudad de México	20.4

\* La procedencia de los pacientes fue considerada de acuerdo a la regionalización de la República Mexicana por el IMSS-COPLAMAR.

TABLA 3  
RELACION ENTRE LA EDAD DEL PACIENTE Y SU RESPUESTA A  
ANTIGENOS FUNGICOS EN IDR

ANTIGENOS CRUDOS	E D A D*	
	<60 AÑOS CASOS POSITIVOS (%)	>60 AÑOS CASOS POSITIVOS (%)
Histoplasmina	1	0
Coccidioidina	7.4	1.1
Paracoccidioidina	11.6	0
Blastomicina	11.6	1.1
Esporotricina	4.2	1.1
Candidina	16.8	1.1
Aspergilina	5.3	0
TOTAL DE CASOS	92.6	7.4

\*Rango de edad de los pacientes: 17-75 años.

IDR = INTRADERMORREACCION

TABLA 4

RESPUESTA DE LOS ANTIGENOS CRUDOS FRENTE A PRUEBAS DE  
INMUNODIFUSION Y CONTRAINMUNOELECTROFESIS

ANTIGENOS	PRUEBAS HUMORALES	
	INMUNODIFUSION %	CONTRAINMUNO ELECTROFESIS %
Histoplasmina	7.1	27.5
Blastomicina	0	28.5
Paracoccidioidina	18.3	43.8
Coccidioidina	1.0	23.4
Esporotricina	1.0	19.3
Candidina	3.0	3.0
Aspergilina	9.1	3.0

Como se puede observar en la tabla 7, la reactividad de los sueros frente a los antígenos de *Histoplasma*, *Coccidioides* y *Paracoccidioides* baja a 0 en las pruebas de ID y CIE al utilizar los antígenos purificados (CPP-D's). En la tabla 8 podemos observar también que el porcentaje de reactividad se reduce en la prueba de ELISA al utilizar los antígenos purificados.

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

La población de pacientes estudiados correspondió solamente a mujeres, debido a que se inició el estudio en un pabellón del hospital que comprenda únicamente pacientes de sexo femenino. El estudio continuará más adelante con otros pabellones, donde la población comprenda también individuos del sexo masculino. Sin embargo, la característica del sexo de esta población estudiada debe ser tomada en consideración, ya que se ha tratado de comprometer diferentes respuestas de susceptibilidad del huésped a infecciones fúngicas dependiendo del sexo del sujeto. A nivel experimental se ha visto que las hembras desarrollan más resistencia a la enfermedad en modelos animales frente a infecciones por *Histoplasma capsulatum* (Taylor *et al.*, 1982) y *Cryptococcus neoformans* (Muchmore *et al.*, 1982). Sin embargo, en humanos, la menor frecuencia de infecciones fúngicas en el sexo femenino se ha

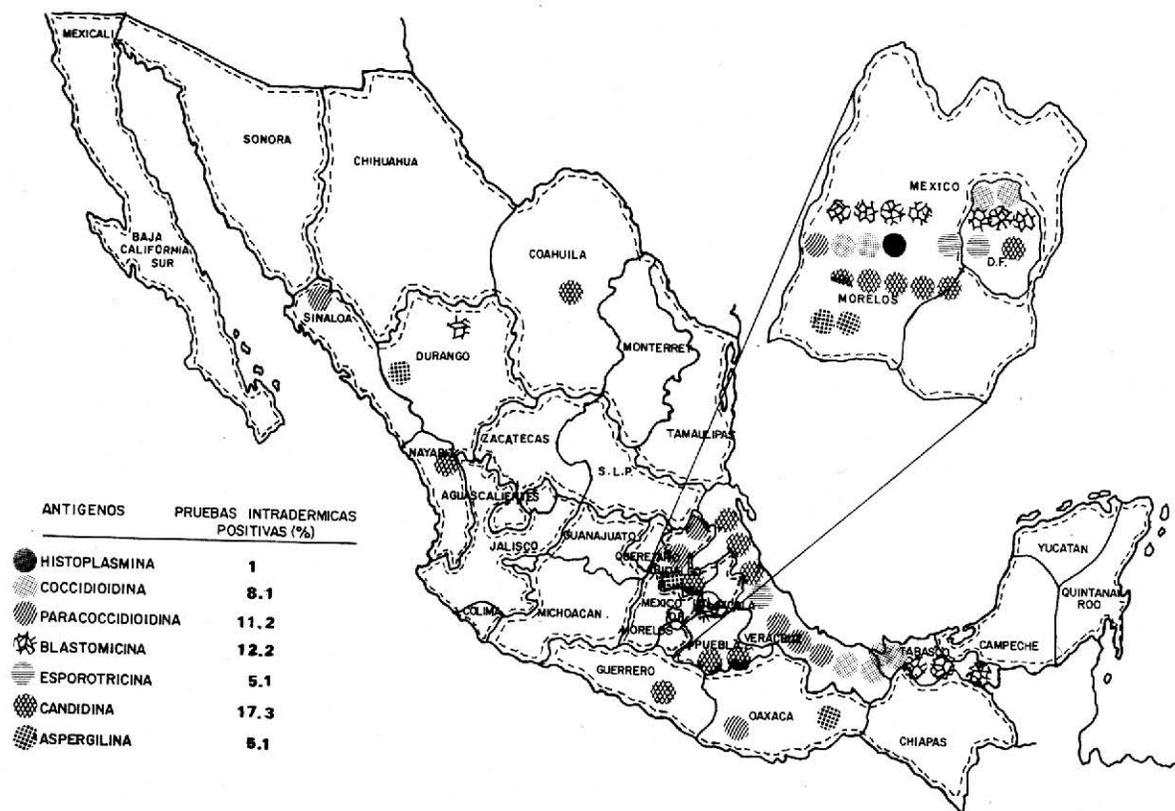


Fig. 1. Relación entre pruebas intradérmicas a antígenos fúngicos y la procedencia de los pacientes.

TABLA 5

RELACION ENTRE PACIENTES CON TUBERCULOSIS/DIABETES  
Y POSITIVIDAD A PRUEBAS INMUNOLOGICAS  
CON ANTIGENOS FUNGICOS

PACIENTES	DIAGNOSTICO	POSITIVIDAD PRUEBAS INMUNES	ANTIGENO
A.M.G.	Tuberculosis Diabetes	CIE, IDR. RFC (1:64)	Candidina
L.M.A.	Tuberculosis Diabetes	IDR RFC (1:16)	Candidina
E.O.E	Tuberculosis Diabetes	RFC (1:8)	Candidina

TABLA 6

## CORRELACION ENTRE PRUEBAS INMUNES Y ANTIGENOS FUNGICOS

TODOS LOS ANTIGENOS	IDR/ID	P > 0.05*
COCCIDIOIDINA	IDR/CIE	P < 0.05
CANDIDINA	IDR/RFC	P < 0.05

\* Análisis estadísticos por  $\chi^2$ 

IDR : Intradermorreacción.

ID : Inmunodifusión.

RFC : Reacción de Fijación de Complemento

TABLA 7

## COMPARACION DE ANTIGENOS FUNGICOS, CRUDOS Y PURIFICADOS EN PRUEBAS INMUNOLOGICAS

ANTIGENOS	REACTIVIDAD	
	ID %	CIE %
Histoplasmina	7.1	27.5
CPP-D-histo	0	0
Coccidioidina	1.0	23.5
CPP-D-cocci	0	0
Paracoccidioidina	18.4	43.9
CPP-D-paracocci	0	0

ID : Inmunodifusion

CIE : Contrainmunolectroforesis.

TABLA 8

## COMPARACION DE ANTIGENOS FUNGICOS CRUDOS Y PURIFICADOS (CPP-D) EN ELISA

ANTIGENOS	ELISA* % DE REACTIVIDAD **
HISTOPLASMINA CPP-D	66.6 46.6
COCCIDIOIDINA CPP-D	53.3 NH
PARACOCIDIOIDINA CPP-D	40 33.3

\* Elisa indirecta utilizando un conjugado con fosfatasa alcalina anti IgG, anti IgM (CORDIS-USA), estimada por absorbancia a 405 nm, corrigiendo los valores con la absorbancia no específica de sueros normales.

\*\* De 15 sueros con bandas en inmunodifusión y contrainmunolectroforesis. NH no hecho.

relacionado con el carácter ocupacional del huésped, ya que son los hombres los que están más expuestos al hábitat natural del hongo debido a su actividad laboral (Rippon, 1974). Estas observaciones deben ser tomadas en cuenta para explicar la baja reactividad en pruebas cutáneas, por ejemplo, a antígenos de *H. capsulatum* (1%), *C. immitis* (8.1%), *P. brasiliensis* (11.2%), entre otros. Al ubicar la procedencia de los pacientes según las regiones de la República Mexicana, se observó que la reactividad de los antígenos en su mayoría, correspondía a zonas endémicas para los diferentes hongos estudiados, por ejemplo, la mayoría de los pacientes reactivos a la IDR con paracoccidioidina provenía de la región que comprendía el Estado de Veracruz, la cual coincide con una de las zonas endémicas más importantes de paracoccidioidomicosis en México. Sin embargo, la prueba de la coccidioidina fue la única que no pudo relacionarse con la conocida zona endémica de coccidioidomicosis en los Estados del norte de la República. Este hecho puede explicarse de dos ma-

neras, una, que el paciente en algún momento estuvo en la región endémica habiéndose sensibilizado, o bien, la respuesta detectada puede deberse al cruce de otros antígenos como la paracoccidioidina e histoplasmina.

Los resultados obtenidos con blastomicina ameritan una discusión particular, ya que el haber encontrado una reactividad de 28.5% en CIE (Tabla 4) se debe posiblemente al conocido hecho de la gran reactividad cruzada que presenta *B. dermatitidis* con *H. capsulatum* y *P. brasiliensis* y la mayor sensibilidad de la técnica de CIE sobre otras pruebas como la ID que pudieran poner de manifiesto estos resultados falsos positivos, considerando que esta enfermedad no ha sido descrita en México.

Las características de asociación de la infección tuberculosa con infecciones por hongos, se ve bien ejemplificada en la relación tuberculosis/diabetes (12%). El hecho de que el 25% de estos pacientes presentaron pruebas inmunes positivas a la candidina (Tabla 5), sugiere fuertemente una asociación con *Candida* lo que es muy frecuente en pacientes diabéticos.

El empleo de las diferentes pruebas inmunes con los antígenos fúngicos nos permitió discriminar aquellas pruebas que presentaban una mayor relación, observando que las pruebas que más correlacionaban entre sí fueron la IDR con la CIE al utilizar la coccidioidina y la IDR con la RFC al utilizar candidina (Tabla 6). Esto podría sugerir la importancia del uso de estas pruebas para el diagnóstico y pronóstico de padecimientos micóticos.

De un modo general, los antígenos crudos presentaron una mayor reactividad que los antígenos purificados, particularmente en pruebas de menor sensibilidad como la inmunodifusión en gel y la contrainmunolectroforesis (Tabla 7) donde los antígenos purificados no fueron funcionales, sin embargo, estos antígenos son útiles en pruebas de mayor sensibilidad como la ELISA. A pesar de presentar menor reactividad que los antígenos crudos, éstos son quizás más útiles porque exhiben un menor grado de reactividad cruzada. Los antígenos crudos por reaccionar en pruebas de fácil manejo y rápida detección, serían los ideales para estudios de tipo general y epidemiológicos, mientras que los purificados los ideales para pruebas de diagnóstico y pronóstico.

Finalmente, el estudio indicó un probable contacto de los pacientes con los agentes etiológicos de las micosis estudiadas y el ampliar la población de trabajo, sobre todo la del sexo masculino, nos dará una indicación más clara de la respuesta de la población a los antígenos fúngicos utilizados.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fué financiado por el CONACYT (PCSABNA-021454), Institución a la que se le expresa un reconocimiento. Se agradece ampliamente a Gabina Arenas y Amelia Pérez por su ayuda en la obtención de los antígenos utilizados en este estudio.

## LITERATURA CITADA

- Carrada, L.P., 1962. Encuesta epidemiológica de micosis en hospitales para tuberculosos. *Rev. Med. IMSS*. 50: 33-38.
- González Ochoa, A. y M.L. Furcolow, 1960. Histoplasmosis in a Mexican Sanatory. *Lab. Invest.* II: 1134-1139.
- González Ochoa, A., 1967. Coccidioidomycosis in Mexico. Proceedings 2nd. Coccidioidomycosis Symposium. *Universidad of Arizona Press, Tucson*.
- Kirby, K.S., 1956. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *J. Biochem.* 64: 405.
- Lowry, O.H., N.Y. Rosebrough, A.L. Tarr y R.T. Randall, 1951. Protein measurements with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Morris, D.L., 1948. Quantitative determination of carbohydrates with dreywood's anthrone reagent. *Science* 107: 254-255.
- Muchmore, H.G., E.N. Scott, F.G. Felton y R.A. Fromtling, 1982. Sex differences in the virulence of *Cryptococcus neoformans* for adult mice. In: M. Baxter (Ed.), Proceedings VIII Congress of ISHAM, Massey University, Palmerston North, Nueva Zelandia. pp. 152-155.
- OPS, 1975, *Manual de procedimientos estandarizados para el serodiagnóstico de las micosis sistémicas, II*. Reacciones de fijación del complemento. Oficina Sanitaria Panamericana. *Publ. Cient.* 307, Washington, D.C.
- Ouchterlony, O. y L.A. Nilsson, 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Qeir D. M. (Ed), *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Rippon, J.W., 1974. *Medical Mycology*. W.B. Saunders. Filadelfia.
- Sevag, M.G., 1934. Eine neue physikalische Enteiweissungsmethod zur darstellung biologisch. Wirksamer substanzen. Idolierung von Kohlenhydraten aus huhnereiweiss and pneumococcen. *Biochem Z.* 273: 419-429.
- Taylor, M.L. y L.F. Bojalil, 1977. Inmunología de la histoplasmosis. Aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmunoespecífica a partir de *Histoplasma capsulatum*. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 8: 91-102.

- Taylor, M.L., M.R. Reyes Montes, G.R. González, J. Casasola y A. Hernández Ramírez, 1982. Immune response changes with age and sex as factors of variation in resistance to **Histoplasma** infection. In: M. Baxter (Ed), Proceeding VIII Congress of ISHAM, Massey University, Palmerston North, Nueva Zelandia. pp. 260-264.
- Toriello, C. y F. Mariat, 1974. Etude comparée des polysides des champignons **Ceratocystis stenoceras** et **Sporothrix schenckii**. Composition chimique et analyse immunologique. **Ann Microbiol. (Institut Pasteur) 125A**: 287-307.
- Toriello, C., J.L. Rosas, M.R. Reyes Montes, y M.L. Taylor, 1982. Biochemical studies of polysaccharide protein antigens from fungi causing systemic mycosis. In: M. Baxter (Ed.), Proceedings VIII Congress ISHAM Massey University, Palmerston North, Nueva Zelandia. pp. 220-224.
- Velasco, O., 1981. **Paracoccidioidomycosis**. Informe técnico No. 5, Dir. Gral. de Epidemiología, S.S.A. México.
- Velasco, O., 1985. Aspectos epidemiológicos de la histoplasmosis en México. **Rev. Inv. Sal. Pub. (Mex.)** (En Prensa).
- Voller, A., D.E. Bidwell y A. Bartlett, 1979. **The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**. Nuffield Laboratories of comparative Medicine & The Zoological Society of London, Londres.