



Preparación de un antígeno de *Madurella mycetomatis* aplicable al diagnóstico de micetoma

María Juliana Araujo, Elisabeth Castañeda

Laboratorio de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Santa Fé de Bogotá, Colombia

Resumen

En este trabajo se estandarizó la preparación de antígenos metabólicos y citoplásmicos de *Madurella mycetomatis*, mediante curvas de crecimiento del agente en dos medios líquidos diferentes, las cuales fueron establecidas por la concentración de proteínas, carbohidratos y peso seco. Los antígenos se valoraron en pruebas de inmunoprecipitación con antisueros preparados en conejos así como en sueros de pacientes. Se determinó que tres semanas de cultivo en caldo glucosado de Sabouraud al 2%, a 37 °C con agitación constante representaban las condiciones óptimas para la preparación de los antígenos. Sin embargo, se obtuvieron exoantígenos desde la primera semana de incubación. Se observó que los antígenos metabólicos y citoplásmicos presentaron reacción cruzada y por inmunotransferencia, se estableció que compartían tres proteínas con pesos moleculares de 33, 56 y 125 kDa. Debido a ello y al no encontrar diferencias de inmunogenicidad, se sugiere emplear el antígeno metabólico, el cual adicionalmente es más sencillo de preparar. Igualmente se recomienda emplear la contraelectroforesis como prueba diagnóstica.

Palabras clave

Micetoma, Inmunodiagnóstico, Antígenos metabólicos, Antígenos citoplásmicos.

Madurella mycetomatis antigen for the serodiagnosis of mycetoma

Summary

The aim of this work was to standardize metabolic and cytoplasmic *Madurella mycetomatis* antigen to be applied in the immunodiagnosis of mycetoma. Growth curves were established growing the mold in two broth media with weekly measures of protein and carbohydrate levels and of dry weight. Sera from immunized rabbits and patient's sera were used in immunoprecipitation to test the antigens. Three weeks old shaken cultures in Sabouraud broth at 37 °C were established as the optimal conditions to prepare cytoplasmic and metabolic antigens. Nevertheless, exoantigens were produced since the first week. Metabolic and cytoplasmic antigens presented cross reaction and by immunoblotting they shared 33, 56 and 125 kDa molecular weight proteins. Preparation and use of the metabolic antigens is recommended for the immunodiagnosis of mycetoma when using the counterimmunoelectrophoresis technique.

Key words

Mycetoma, Immunodiagnosis, Metabolic antigens, Cytoplasmic antigens.

El micetoma es una entidad crónica que afecta el tejido subcutáneo y las estructuras adyacentes [1,2] Se reconoce la multiplicidad etiológica de esta entidad, que puede ser ocasionada por bacterias (actinomietoma) o por hongos (eumietoma) [3-5].

En Colombia la enfermedad se ha informado en una decena de casos, por lo cual se asume que es poco frecuente. La mayoría de los casos descritos han sido producidos por actinomietos como *Nocardia brasiliensis* y muy excepcionalmente, por eumietos como *Madurella*

sp, *Fusarium* sp y *Scedosporium* sp [6,7]. El diagnóstico de dos casos de micetoma en los departamentos de Atlántico y Bolívar, ocasionados por *Madurella mycetomatis* [8], constituye un hallazgo importante, debido a que no había sido informado este agente etiológico de micetoma en nuestro país. Por esta razón se realizó el estudio de este microorganismo con el propósito de establecer un método adecuado de inmunodiagnóstico.

Los estudios realizados en áreas endémicas de micetomas, con pruebas inmunológicas como la precipitación en agar, indican la existencia de anticuerpos precipitantes en el suero de pacientes. Sin embargo, estas técnicas han detectado reacciones cruzadas atribuibles a las preparaciones antigénicas, por la estrecha relación entre los agentes etiológicos de micetoma [9].

Con estos argumentos se planteó la necesidad de estandarizar la preparación de antígenos metabólicos y citoplásmicos *M. mycetomatis* aplicables en el serodiagnóstico del micetoma.

Dirección para correspondencia:

Dra. Elisabeth Castañeda, Laboratorio de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Avenida Eldorado, carrera 50, Santa Fé de Bogotá, Colombia.
Fax: 57-1-222-3055, 57-1-222-0194.

Aceptado para publicación el 6 de septiembre de 1996.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos. Los dos aislamientos de *M. mycetomatis* empleados, INS-41-1 e INS-41-2 fueron obtenidos de dos pacientes de la Costa Atlántica [8] y remitidos al laboratorio de Micología del INS para su confirmación. Estos aislamientos se mantuvieron en agar glucosado de Sabouraud al 4%, incubado a 37 °C con resiembras cada 15 días.

Preparación del antígeno

1. **Inóculo inicial.** Se sembraron colonias de aproximadamente 0,5 cm de diámetro en agar glucosado de Sabouraud al 4% y Czapek con glucosa al 4%; los medios se incubaron a 37°C durante cinco semanas. La determinación del crecimiento se realizó por medición semanal del diámetro de la colonia [4].

2. **Curva de crecimiento.** Se sembraron los inóculos, previamente estandarizados en agar, en caldo glucosado de Sabouraud al 2% y en caldo Czapek con glucosa al 2%. La incubación se realizó a 37 °C, en agitación a 150 rpm, por seis semanas. Semanalmente, se determinó en el sobrenadante la concentración de proteínas [10] y carbohidratos [11] y se determinó el peso seco del micelio. Para la determinación de este último, las hifas se recolectaron por filtración, se lavaron tres veces con tampón fosfato salino pH 7,2, se secaron a 37 °C durante 48 h y se pesaron en recipientes previamente tarados.

3. **Antígenos metabólico y citoplásmico.** El inóculo, previamente estandarizado, fue sembrado en caldo glucosado de Sabouraud al 2%, e incubado a 37 °C con agitación (150 rpm). El tiempo de incubación fue determinado con la curva de crecimiento; posteriormente se verificó la ausencia de contaminación y el cultivo se inactivó con formalina al 2% durante 48 h.

El sobrenadante del cultivo que constituyó el antígeno metabólico fue concentrado con polietilenglicol (Laboratorios Merck, RFA) (100 g/L) y dializado en solución salina 0,15 M por 24 h, se determinó en él la concentración de proteínas y carbohidratos [10,11] y se almacenó a -70 °C en alícuotas de 1 ml.

El antígeno citoplásmico fue preparado con una modificación del método de Wethered *et al.* [12]. El micelio se recolectó por filtración, se lavó tres veces con tampón fosfato, se homogeneizó mecánicamente por 45 min, empleando un homogenizador (Con-Torque Eberbarch Corp., USA) y se sonicó según las condiciones estandarizadas, en un equipo Virsonic 300 (Virtis Co. Inc, USA). Para determinar la eficacia del tratamiento, se cuantificó, en el sonicado, la concentración de proteínas liberadas con relación al tiempo y se determinó la integridad de las hifas por observación microscópica. Posteriormente, la suspensión fue centrifugada a 3.000 rpm, a 4°C durante 45 min, se determinó en el sobrenadante la concentración de proteínas [10] y carbohidratos [11], y se almacenó a -70 °C en alícuotas de 1 ml. Semanalmente, se midió en el sobrenadante del cultivo y en el extracto citoplásmico la actividad antigénica con el empleo de pruebas de precipitación en agar.

Sueros. El estudio se realizó con los siguientes sueros: a) sueros de dos pacientes con diagnóstico de micetoma provenientes de la Costa Atlántica, a quienes se les aisló *M. mycetomatis*, aislamientos INS 41-1 e INS 41-2, b) sueros de dos habitantes de la región (controles negativos), c) sueros de conejos normales, previa inmunización y d) sueros de conejo inmunizados con los antígenos citoplásmicos de los dos aislamientos como se explica a continuación.

Antisuero de conejo. Se inocularon, por vía subcutánea, cuatro conejos Nueva Zelanda, machos con un peso de 2500 g, con una suspensión del antígeno citoplásmico del aislamiento 41-1 (conejos 1 y 2) y 41-2 (conejos 3 y 4) (concentración de proteínas 1 mg/ml), emulsificado en volúmenes iguales con adyuvante completo de Freund (Sigma, EEUU). La inoculación se realizó por cuatro semanas con tres refuerzos, según el esquema de Reeves [13]. Los conejos fueron sangrados las semanas 0, 5, 7, 9 y 11, los sueros obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

Pruebas serológicas

1) **Inmunodifusión (ID).** La prueba se realizó en un gel de agarosa (Sigma, EEUU) al 1% en solución salina al 0,85%, según la técnica descrita por Mahgoub [14]. La cuantificación de anticuerpos precipitantes se realizó empleando diluciones seriadas de los sueros. Adicionalmente, con esta prueba, se titularon los antígenos metabólicos y citoplásmicos de los dos aislamientos y se midió la actividad antigénica semanal. La lectura de la prueba se realizó a partir de las 24h, hasta una semana. Para eliminar las reacciones inespecíficas, las placas se lavaron en una solución de citrato de sodio al 1% [9].

2) **Contrainmunolectroforesis (CIE).** Se empleó el método descrito por Gumma *et al.* [9], con agar Noble (Difco, EEUU) en un tampón barbital acetato pH 7,2. Con esta técnica se titularon antígenos y antisueros, anotando el título y número de bandas de precipitación.

3) **Inmunotransferencia (IT).** Se realizó según la técnica descrita por Towbin *et al.* [15,16]. La inmunodelección se realizó con el empleo de conjugados anti-IgG humana y anti-IgG de conejo, marcadas con fosfatasa alcalina (Sigma, EEUU); el revelado se realizó con azul de nitrotetrazolio. Como controles se emplearon marcadores de peso molecular, los cuales fueron sometidos a electroforesis y localizados con azul de Coomassie R250 (Sigma, EEUU).

RESULTADOS

Condiciones de crecimiento

Inóculo inicial. Con base en el diámetro de la colonia, se determinó, en los dos medios empleados, que tres semanas constituían el tiempo óptimo para la preparación del inóculo inicial. En este tiempo el diámetro promedio fue de 2,5 cm para ambos aislamientos.

Curva de crecimiento

Antígeno metabólico. La concentración de proteínas y carbohidratos de ambos aislamientos presentaron un comportamiento similar en los dos medios probados. En el caldo glucosado de Sabouraud al 2%, la liberación máxima de proteínas y carbohidratos se anotó en la semana 4 (Figura 1)

En el caldo Czapek con glucosa al 2%, la concentración de proteínas de los dos aislamientos fue máxima a la semana 2, cuando se obtuvieron concentraciones de proteínas de 13 mg/ml y de 13,5 mg/ml respectivamente. La concentración de carbohidratos fue máxima en la primera semana de incubación, con concentraciones de 3160 mg/ml y 2600 mg/ml, respectivamente.

Extracción del contenido citoplásmico. Se establecieron como óptimas las siguientes condiciones de sonicación: un tiempo de 80 min y una amplitud del 70%. Bajo estas condiciones, la concentración de proteínas fue de 1,6 mg/ml con los dos aislamientos y el porcentaje de hifas destruidas fue del 95%.

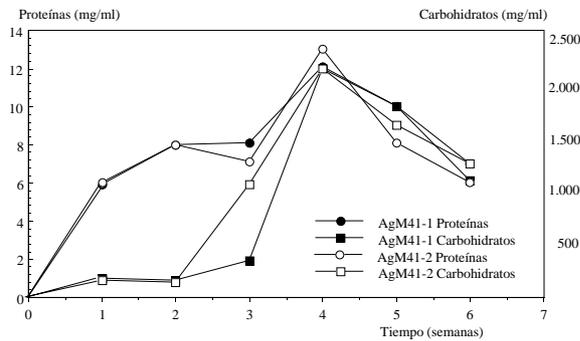


Figura 1. Concentración de proteínas y carbohidratos de los antígenos metabólicos de *Madurella micetomatis* con relación al tiempo de incubación.

Antígeno citoplásmico. En la tabla 1 se presentan los resultados de la concentración de proteínas, carbohidratos y peso seco del antígeno citoplásmico de los aislamientos 41-1 y 41-2 en el caldo Sabouraud al 2%.

La curva del antígeno citoplásmico en el caldo Czapek demostró resultados similares con los dos aislamientos, la concentración de proteínas (1 y 1,1 mg/ml), carbohidratos (2600 y 2800 mg/ml) y peso seco (2 y 2,5 g) fueron máximos en la segunda semana.

Con base en los resultados anteriores se estableció que tres semanas en el caldo glucosado de Sabouraud al 2%, constituía el tiempo óptimo para la preparación del antígeno citoplásmico. Estas mismas condiciones de cultivo se utilizaron también en la preparación del antígeno metabólico. Bajo estas condiciones, las concentraciones de proteínas para los antígenos citoplásmicos 41-1 y 41-2 fueron de 1,4 y 2,44 mg/ml y las concentraciones de carbohidratos fueron 1650 mg/ml y 1320 mg/ml, respectivamente. Para los antígenos metabólicos las concentraciones de proteínas fueron 546 y 1160 mg/ml, respectivamente.

Tabla 1. Producción del antígeno citoplásmico en el caldo de Sabouraud al 2% de los dos aislamientos de *Madurella micetomatis* con relación al tiempo de incubación.

Variables	Tiempo (semanas)					
	1	2	3	4	5	6
Proteínas (mg/ml)						
Ag 41-1	0,71	1,1	1,3	1,3	1,2	0,8
Ag 41-2	1,6	2,1	1,9	1,6	1,3	0,6
Carbohidratos (mg/ml)						
Ag 41-1	306	1935	2370	644	410	220
Ag 41-2	159	600	1557	938	580	160
Peso seco (g)						
Ag 41-1	0,4	3,6	4,3	3,4	2,4	1,5
Ag 41-2	1,2	3,6	4,5	3,2	2,6	2,1

Evaluación inmunológica

Titulación de antisueros. Las bandas de precipitación obtenidas con los sueros de 4 conejos inmunizados se observan en la figura 2, al comparar los títulos de anticuerpos y el número de bandas obtenidos, no se aprecian diferencias serológicas significativas, pero se observó que sólo en el conejo 1 se obtuvo un título de anticuerpos mayor con el antígeno homólogo. En el conejo 3 se obtuvo el mayor título de anticuerpos frente a los antígenos citoplásmicos y metabólicos (Tabla 2).

Titulación de antígenos. En la tabla 3 se presentan los resultados de la titulación de los antígenos citoplásmicos y metabólicos de ambos aislamientos provenientes de lotes diferentes, relacionados con la concentración de pro-

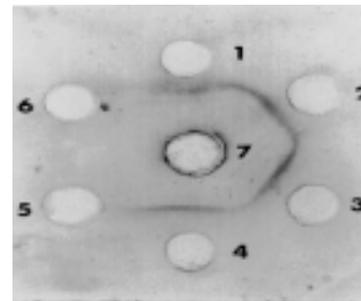


Figura 2. Reactividad de los antisueros de conejo en la inmunodifusión, con el empleo del antígeno citoplásmico del aislamiento 41-1. Los sueros 1 a 4 corresponden a los conejos con esa misma numeración; 5 y 6: Controles negativos; 7. Antígeno citoplásmico 41-2.

Tabla 2. Títulos y número de bandas del suero del conejo 3 frente a los antígenos citoplásmicos y metabólicos de los dos aislamientos de *Madurella micetomatis*.

Prueba		Ag citoplásmico		Ag metabólico	
		Aislamiento 41-1	41-2	Aislamiento 41-1	41-2
ID	Título	128	128	64	64
	Nº bandas	2	1	1	1
CIE	Título	128	256	64	64
	Nº bandas	1	2	2	2

ID: inmunodifusión, CIE: contrainmunolectroforesis. El conejo 3 fue inmunizado con antígeno citoplásmico del aislamiento 41-2.

teínas y carbohidratos; para la titulación se utilizó el suero del conejo 3.

Actividad antigénica semanal. La determinación de la actividad antigénica semanal de los sobrenadantes y extractos citoplásmicos se expresan en la figura 3.

Titulación de sueros de pacientes. Los sueros de los dos pacientes con micetoma no fueron positivos por ID. Por CIE uno de los pacientes presentó títulos de anticuerpos de 1:4 con los antígenos citoplásmicos y 1:2 con los antígenos metabólicos. El suero del otro paciente presentó títulos de anticuerpos de 1:2 con los dos antígenos citoplásmicos y con el antígeno metabólico del aislamiento 41-1. Los sueros controles fueron no reactivos en las dos técnicas.

Tabla 3. Titulación de antígenos citoplásmicos y metabólicos de los dos aislamientos de *Madurella micetomatis* con el empleo de inmunodifusión y contrainmunolectroforesis.

Prueba	Título*	Características	
		Proteínas (mg/ml)	Carbohidratos (mg/ml)
ID	Ag. citoplásmico	41-1	64
		41-2	32
	Ag. metabólico	41-1	256
		41-2	256
CIE	Ag. citoplásmico	41-1	128
		41-2	256
	Ag. metabólico	41-1	256
		41-2	512

Para la titulación se empleó el suero del conejo 3. * Recíproco del título

Inmunotransferencia. Después de la inmunotransferencia de las fracciones proteicas provenientes de los antígenos citoplásmicos y metabólicos, se identificaron antígenos que fueron reconocidos con una respuesta de IgG en el conejo 3 y en los dos pacientes con micetoma.

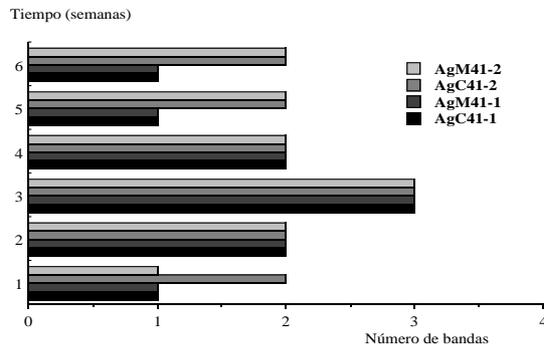


Figura 3. Actividad antigénica semanal de sobrenadantes y extractos citoplásmicos de dos aislamientos de *Madurella mycetomatis* por CIE.

El suero del conejo reconoció cinco fracciones del antígeno metabólico, con pesos moleculares de 26 a 125 kDa (26, 33, 56, 85, 125 kDa) y 7 fracciones del antígeno citoplásmico, con pesos moleculares de 33 a 125 kDa (33, 51, 56, 61, 81, 125 kDa). Se estableció que los dos antígenos compartían tres fracciones de 33, 56 y 125 kDa.

Los sueros de los dos pacientes reconocieron las proteínas de 79, 81 y 84 kDa del antígeno citoplásmico y las de 78 y 81 kDa del antígeno metabólico. Los dos sueros control fueron negativos con los cuatro antígenos.

DISCUSIÓN

Por varios años, se han utilizado diferentes preparaciones antigénicas de *M. mycetomatis* para el serodiagnóstico del micetoma eumicótico. Estas preparaciones han incluido filtrados de cultivo y extractos citoplásmicos, preparados en diversos medios de cultivo y bajo diferentes condiciones de crecimiento tales como tamaño del inóculo inicial, tiempo de incubación y temperatura, cultivo estacionario o en agitación; los resultados han sido variables en sensibilidad y especificidad en las pruebas serológicas [9,12,14,16-18].

En este trabajo y previa confirmación macroscópica, microscópica y bioquímica de los aislamientos en estudio, se establecieron las condiciones de crecimiento para la producción de antígenos citoplásmicos y metabólicos de *M. mycetomatis*. El inóculo inicial se escogió con base en el crecimiento del hongo (medición del diámetro de la colonia) en el medio sólido; esta determinación permitió inocular los medios líquidos en una forma semicuantitativa. Este procedimiento, a pesar de haber sido descrito para otro tipo de mohos, no se había empleado para la producción de antígenos de *M. mycetomatis* [6].

Otros métodos para estandarizar el inóculo han incluido el conteo del número de conidias en los mohos que esporulan profusamente [7] y el peso seco de las colonias fúngicas después de cierto tiempo de crecimiento [9,14,19]. Estos dos métodos, no se recomiendan en la preparación del inóculo inicial de *M. mycetomatis* debido a que su esporulación es muy escasa y la determinación del peso seco, es muy dispendiosa.

Las curvas de crecimiento para la producción de antígenos metabólicos y citoplásmicos de *M. mycetomatis* no han sido descritas en la literatura pero en este trabajo, se efectuaron con el objeto de determinar las condiciones óptimas de crecimiento, para la producción de antígenos reproducibles, en dos medios de cultivo, uno complejo (caldo glucosado de Sabouraud al 2%) y uno sintético (caldo Czapek con glucosa al 2%).

En la preparación del antígeno metabólico, no se encontraron diferencias significativas, entre los dos medios de cultivo empleados en relación con la produc-

ción de metabolitos. Sin embargo, en cuanto a los antígenos citoplásmicos sí se establecieron diferencias importantes, ya que la concentración de proteínas obtenida en el medio complejo fue mayor que en el medio sintético. Ello podría indicar que el hongo necesita ciertos componentes presentes en el primer medio, para la síntesis de elementos citoplásmicos. Al comparar la composición de los dos antígenos, es importante resaltar que con el metabólico se obtuvieron concentraciones de proteínas 10 veces más altas que las obtenidas con el citoplásmico; ello podría indicar que las proteínas pueden degradarse por la liberación de proteasas intracitoplásmicas [12]. Es de anotar la gran dificultad en la preparación del antígeno citoplásmico debido a la composición de la pared celular, por lo que fue necesario utilizar técnicas de homogeneización mecánica y prolongados tiempos de sonicación.

Al no encontrar diferencias serológicas significativas en la respuesta inmune a los dos antígenos, se sugiere para las técnicas de ID y CIE, el antígeno metabólico obtenido en el caldo glucosado de Sabouraud a 37°C, en condiciones de agitación que le permitan al hongo una oxigenación adecuada. Esta observación está de acuerdo con lo sugerido por Wethered [12] y Mahgoub [14,17]. Es importante anotar que la presencia de reacciones cruzadas entre los agentes productores de eumicetoma está relacionada con la preparación del antígeno, en estudios posteriores valdría la pena evaluar el antígeno estandarizado con sueros provenientes de pacientes con eumicetomas por otros agentes etiológicos así como de actinomycetomas.

Los títulos de los antígenos preparados se correlacionaron con su alta composición de proteínas y carbohidratos. Adicionalmente, se determinó que todos los sobrenadantes y extractos citoplásmicos de las diferentes semanas de incubación, presentaron actividad antigénica, lo que indicaría que los exoantígenos, inicialmente descritos para la identificación de cultivos de los hongos dimórficos [13,21], se pueden preparar para identificar aislamientos de *M. mycetomatis* al emplear sueros de reactividad conocida. Igualmente, los exoantígenos del hongo pueden emplearse en técnicas de inmunoprecipitación, con el objeto de establecer la presencia de anticuerpos en los pacientes.

Con respecto a la producción del antisuero de conejo, el esquema descrito por Reeves [13], presentó buenos resultados. Al comparar los títulos de anticuerpos de los cuatro conejos se estableció que reconocían los antígenos preparados a partir de los dos aislamientos [12].

Referente a las dos pruebas de inmunoprecipitación utilizadas, no se encontraron diferencias serológicas significativas, al titular los sueros experimentales, los antígenos la actividad antigénica semanal; sin embargo, en la titulación de los sueros de los dos pacientes, los resultados de la ID señalaron su baja sensibilidad, no así la CIE la cual demostró su valor diagnóstico.

La prueba recomendada, para realizar estudios seroepidemiológicos, es la prueba inmunoenzimática ELISA [7], valdría la pena emplear este antígeno estandarizado de *M. mycetomatis*, en esta prueba.

Con el objeto de definir la respuesta de anticuerpos en el micetoma, se realizó la inmunotransferencia, donde se estableció la respuesta de clase IgG con los antígenos citoplásmicos y metabólicos. La presencia de epitopos compartidos entre los dos antígenos con la proteína de 33 kDa descrita por Wethered [12], se confirmó en este estudio al encontrarse tres fracciones con pesos moleculares de 33, 56 y 125 kDa, lo que indica que es posible utilizar el antígeno metabólico en vez del citoplásmico.

Los sueros de los pacientes no presentaron diferen-

cias en el reconocimiento de las fracciones proteicas, se demostró al igual que Wethered [12], que la respuesta de IgG con el antígeno citoplásmico va dirigida a las proteínas de 79, 81 y 84 kDa y con el metabólico a las proteínas de 78 y 81 kDa lo que sugiere que pueden utilizarse como marcadores de micetoma producido por *M. mycetomatis*.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda el protocolo descrito para la producción de

antígenos metabólicos de *M. mycetomatis*, aplicables en el diagnóstico de la enfermedad con el empleo de pruebas de inmunoprecipitación.

Nuestro agradecimiento a los profesionales de los laboratorios de Microbiología, Micobacterias e Inmunología del Instituto Nacional de Salud, por su valiosa colaboración.

Bibliografía

1. Hay R, Mahgoub E, León G, *et al.* Mycetoma. *J Med Vet Mycol* 1992; 30:41-49.
2. Mahgoub E. Mycoses of the Sudan. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1977; 71:184-187.
3. Mahgoub E. Mycetoma. *Quaderni di cooperazione sanitaria* 1976; 13:125-131.
4. Mahgoub E, Murray I. Mycetoma. William Medical Books, London, 1973.
5. Wanke C, Caiuby M, Tooworse Y, *et al.* Mycetoma por *Actinoadura madurae*. Relato de dois casos. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo* 1992; 34:367-372.
6. Kwon-Chung K, Bennet J. *Medical Mycology*. Lea Febiger, Philadelphia, 1992.
7. Rippon J. *Tratado de Micología Médica* (3ª Ed) Interamericana, McGrawHill, México DF, 1990: 79-114.
8. Correa A, de Guevara E, de Salcedo M, de Gómez G. Micetoma eumicótico por *Madurella micetomatis*: presentación de dos casos. *Revista Colombiana de Dermatología* 1995, 4:18-20.
9. Gumma S, Mahgoub E. Counterimmunoelectroforesis in the diagnosis of mycetoma and its sensitivity as compared to immunodiffusion. *Sabouraudia* 1975; 13:309-315.
10. Lowry O, Rosebrough J, Farr A, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-270.
11. Dubois M, Guilles K, Hamilton J. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1986; 28:350-356.
12. Wethered D, Markey M, Ray R, *et al.* Humoral immune responses to mycetoma organism: characterization of specific antibodies by the use of ELISA and immunoblotting. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1988; 82:918-923.
13. Reeves M, Pine L, Bradley G. Characterization and evaluation of a soluble antigen complex prepared from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1974; 9:1033-1044.
14. Mahgoub E. The value of gel diffusion in the diagnosis of mycetoma. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1964; 58:560-563.
15. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding current status and outlook. *J Immunol Methods* 1984; 72:313-319.
16. Towbin H, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Nat Acad Sci USA* 1973; 76:4350-4354.
17. Maclaren M, Mahgoub E, Georgakopoulos E. Preliminary investigation on the use of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of mycetoma. *Sabouraudia* 1978; 16:225-228.
18. Taha A. A serologic survey of antibodies to *Streptomyces somaliensis* and *Actinoadura madurae* in the Sudan using ELISA. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:49-50.
19. Blummer S, Kaufman L. Microimmuno-diffusion test for nocardiosis. *J Clin Microbiol* 1979; 10:308-312.
20. Daniel T. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry and immunological properties. *Microbiol Rev* 1978; 42:84-113.
21. Camargo Z, Unterkircher C, Campoy S, *et al.* Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. *J Clin Microbiol* 1988; 26:2147-2151.