

Anticuerpos monoclonales frente a *Actinomadura madurae*

Antonio S. Velásquez-Mejía¹, Antonio Ramírez-Bárceñas²,
Beatriz Nieves-Blanco¹, J. Antonio Serrano¹, J. Francisco Muñoz³, Librado Ortiz-Ortiz^{2,4}

¹Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

³Laboratorio de Microbiología y Parasitología, ULE, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

⁴Facultad de Medicina, Extensión Portuguesa-ULA, Guanare, Portuguesa, Venezuela

Recibido Abril 17, 2007. Aceptado Mayo 31, 2007

MONOCLONAL ANTIBODIES TO ACTINOMADURA MADURAE

Resumen

Actinomadura madurae es el agente causal del micetoma en humanos. El micetoma es una enfermedad infecciosa crónica, localizada y granulomatosa del tejido subcutáneo, piel y huesos que tiene una distribución particular en las regiones tropicales y subtropicales de nuestro planeta. El micetoma es un proceso patológico en donde el agente causal de fuente exógena, produce granos. La bacteria se encuentra normalmente en el medio ambiente. La infección ocurre en individuos después de que el microorganismo presente en la tierra, penetra a través de la piel por inoculación traumática, y se observa preferentemente en áreas rurales, generalmente en trabajadores del campo que laboran descalzos. En nuestro laboratorio desarrollamos anticuerpos monoclonales frente a *A. madurae* que mostraron ser altamente específicos, como lo prueba su reactividad dirigida hacia *A. madurae* y que no reaccionaron con otros actinomicetos, específicamente: *Nocardia asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *N. rubra*, *Streptomyces somaliensis*, *S. paraguayensis*, *A. pelletieri* y *N. brasiliensis*, como lo demuestran los estudios realizados usando pruebas inmunoenzimáticas e inmunofluorescencia. Los anticuerpos monoclonales ofrecen la posibilidad de ser utilizados en el reconocimiento de *A. madurae* en tejidos infectados. Es necesaria su caracterización para determinar que epitopos reconocen.

PALABRAS CLAVE: *Actinomadura madurae*, actinomicetos, anticuerpos monoclonales, micetoma,

Abstract

Actinomadura madurae is an actinomycete that causes micetoma in human beings. Mycetoma is a localized chronic, and deforming granulomatous infectious diseases of subcutaneous tissues, skin and bones, that is present worldwide in tropical and subtropical regions. Mycetoma is a pathological process in which the causative agent, from exogenous source, produces grains. The organisms are normally present in the environment. Infection occurs in persons after minor penetrating skin injury inoculating soil organisms, occurring preferentially in rural areas, usually among laborers who work barefoot. In our laboratory, we developed monoclonal antibodies that showed to be highly specific recognizing *A. madurae*, and did not react with other actinomycetes, specifically: *Nocardia asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *N. rubra*, *Streptomyces somaliensis*, *S. paraguayensis*, *A. pelletieri* and *N. brasiliensis*, as shown by immunoenzymatic and immunofluorescence assays. These monoclonal antibodies offer the possibility of using them in the recognition of *A. madurae* in infected tissues; it will be necessary to characterize and finding out the type of epitopes they recognize.

KEY WORDS: *Actinomadura madurae*, actinomycetes, monoclonal antibodies, mycetoma.

Introducción

Actinomadura madurae es causante del actinomicetoma humano y su hábitat natural parece ser el medio ambiente, particularmente las capas superficiales del suelo. El micetoma es una entidad clínica que suele confundirse con otras patologías, y que se caracteriza desde el punto de vista anatomoclínico, por lesiones inflamatorias,

deformantes, no dolorosas y fistulosas que comprometen al tejido cutáneo, subcutáneo, aponeurosis y hueso. Las lesiones son el resultado de la implantación traumática del microorganismo del suelo que alcanza los tejidos y da lugar a abscesos, granulomas y fistulas, así como a estructuras granulares (granos) que son características de los diferentes agentes causales (1-2). El micetoma es de distribución mundial; la

mayor incidencia se reporta en la India, Africa y América (3-8), principalmente en México, Brasil y Venezuela (9-13). Los estudios del actinomicetoma en Venezuela se han hecho principalmente con base en casos clínicos particulares, razón por la cual tampoco se conocen con exactitud los aspectos epidemiológicos de la enfermedad. Serrano y col. (13), en una revisión de los casos de actinomicetoma en Venezuela entre 1976 y 1986 reportaron que de 47 casos, *A. madurae* se encontró en 20; *Nocardia brasiliensis* en 13, *Nocardia* sp en 7, *Streptomyces somaliensis* en 4, *N. asteroides* en 2 y *N. otitidis-caviarum* en 1 caso.

El diagnóstico de actinomicetoma incluye el análisis de aspectos epidemiológicos, clínicos, microbiológicos, histológicos, ultrasonido y rayos X (14-15). Hasta la fecha, no existe un método rápido y confiable que garantice un diagnóstico certero. Sin embargo, se han detectado anticuerpos en pacientes infectados con diferentes especies de actinomicetos mediante pruebas de fijación de complemento, doble difusión en agar, contraelectroforesis, ensayo inmunoenzimático (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (14). Desde el punto de vista microbiológico, el diagnóstico de la infección es difícil por las características propias del organismo causal, ya que son de crecimiento lento y además pueden, en determinadas condiciones, producir formas L en los tejidos (16). De manera general, la identificación de las especies no es fácil y a veces se lleva a cabo en laboratorios de referencia que los identifican por análisis de la secuencia del ARN ribosomal 16S (*ribotyping*) y otras técnicas moleculares (17-18). Por otra parte, el inmunodiagnóstico por medio de anticuerpos policlonales no es confiable, por la elevada reactividad cruzada entre las especies (19). Una de las dificultades es no disponer de antígenos lo suficientemente específicos para utilizarlos en pruebas de diagnóstico, tanto in vivo como in vitro. Sin embargo, el inmunodiagnóstico, método en el cual se pueden usar los anticuerpos monoclonales, ofrece innegables ventajas en el sentido de disminuir el tiempo del diagnóstico etiológico y evitar así el problema de la reactividad cruzada, la cual es tan evidente en este grupo de bacterias (20-21).

En el presente reporte, se describe el uso potencial de los anticuerpos monoclonales, como alternativa en la búsqueda de una prueba que

resulte altamente específica en el diagnóstico de micetoma causado por *A. madurae*.

Material y Métodos

Microorganismos

Se utilizaron cepas de *A. madurae*, *N. asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *N. rubra*, *S. somaliensis*, *S. paraguayensis*, *A. pelletieri* y *N. brasiliensis*, suministradas por el Dr. José Antonio Serrano de la Universidad de Los Andes.

Preparación de los extractos antigénicos

Obtención de la biomasa. Las diferentes cepas de actinomicetos se cultivaron a 37°C en matraces de 1000 ml que contenían 500 ml de medio de Proskauer, Beck y Youmans (22), e incubadas con agitación durante 4-6 semanas. Al cabo de dicho tiempo, los cultivos se trataron con formalina al 1% por 24 h y se centrifugaron a 8 000 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavo tres veces con una solución 0.15 N de cloruro de sodio estéril y posteriormente se conservó en forma liofilizada.

Obtención del extracto total. Se pesaron 20 mg del material liofilizado de cada uno de los diferentes actinomicetos y se colocaron por separado en 100 ml de un amortiguador de fosfato salino (PBS) de pH 7.2; a continuación se homogeneizaron, usando un homogenizador de vidrio Pyrex y luego dos veces por un fraccionador de células Sorvall Ribi modelo RF-1, a una presión de 40 000 psi. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry et al. (23). El extracto de cada microorganismo se utilizó como el antígeno de trabajo.

Preparación de anticuerpos monoclonales

Se usaron ratones BALB/c a los cuales se les hizo una previa determinación de anticuerpos frente a *A. madurae*, para descartar su presencia. Una vez eliminada esa posibilidad, se inmunizaron por vía intraperitoneal con 1 mg del antígeno de *A. madurae*, incorporado en adyuvante incompleto de Freund. La inoculación se repitió una y dos semanas más tarde con 100 µg del extracto crudo sin adyuvante. Una semana después de la última

inyección, se evaluó nuevamente la presencia de anticuerpos, seleccionando los animales que mostraron títulos más elevados, para luego ser inoculados por vía intravenosa con el antígeno, a una concentración de 100 µg de proteína; al cabo de tres días los ratones se sacrificaron y se les extrajo el bazo.

Las células aisladas del bazo de ratón se fusionaron siguiendo el esquema de Köhler y Milstein (24), con células de mieloma múrido de la línea Sp2/0, en una proporción de 5:1, en presencia de polietilenglicol 1300-1600 (Sigma Chemical Co.). Los cultivos de hibridomas se establecieron y mantuvieron en medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM-Gibco Laboratories), el cual al momento de la fusión contenía hipoxantina y timidina (DMEM-HT, Sigma Chemical Co.), además de suero fetal bovino al 20%, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y L-glutamina (Gibco Laboratories). Al día siguiente, los cultivos recibieron DMEM-HT con aminopterina a doble concentración (DMEM-HA2T); seis días más tarde las células se alimentaron con DMEM-HAT (aminopterina a concentración normal), y luego de un segundo cambio se pasaron a DMEM-HT. Finalmente se crecieron en DMEM completo. Los sobrenadantes de los cultivos se analizaron para determinar la presencia de anticuerpos frente a la cepa de *A. madurae*, utilizando para ello el ELISA (25). Los cultivos positivos, es decir que contenían anticuerpos, se clonaron por dilución limitante en agar semiduro. Además, alícuotas de dichos cultivos se conservaron en nitrógeno líquido. Después de la clonación, se ensayaron nuevamente los sobrenadantes de los híbridos que mostraron crecimiento. Los híbridos que resultaron positivos se reclonaron y se congelaron en nitrógeno líquido.

Caracterización y especificidad de los anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos presentes en los sobrenadantes se caracterizaron mediante la prueba de ELISA, utilizando inmunoglobulinas anti-ratón marcadas con peroxidasa de rábano (anti-IgA, anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2b e IgM, Zymed Laboratories). La especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos se realizó por ELISA, enfrentando los sobrenadantes de los híbridos a extractos antigénicos de otras cepas de actinomicetos, específicamente: *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N.*

otitidis-caviarum, *S. somaliensis*, así como a la de *A. madurae*. De igual forma, se realizaron pruebas de especificidad por inmunofluorescencia indirecta, usando como antígenos células completas de *N. asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *N. rubra*, *S. somaliensis*, *S. paraguayensis*, *A. pelletieri*, *N. brasiliensis*, y la homóloga de *A. madurae*. Las diferentes cepas se prepararon en cultivos de caldo infusión cerebro-corazón (*Bacto Brain Heart Infusión*, Difco), hasta obtener un desarrollo confluyente durante un período de 30 días. Las cepas se trataron con formalina al 1% por 24 h. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS. En tubos de ensayo se colocaron 1 ml del sedimento, 5 ml de PBS, y después se diluyeron 1:10. Las suspensiones bacterianas así tratadas, se incubaron de manera independiente con los sobrenadantes de las clonas de hibridomas productoras de anticuerpos monoclonales frente a *A. madurae*.

Determinación de anticuerpos por ELISA

Se sensibilizaron placas de poliestireno (Costar) con el extracto total de la bacteria diluido en un amortiguador de carbonatos de pH 9.6 (10 µg/50 µl por pozo) durante 18 h a 37°C. A continuación se lavaron tres veces con PBS enriquecido con 0.05% de Tween 20, durante 3 min cada uno. Ulteriormente se colocaron en cada pozo 200 µl de PBS enriquecido con 1% de albúmina sérica bovina y 0.05% de Tween 20 y se incubaron a 37°C durante 60 min. Las placas se lavaron tres veces como en el paso anterior. A continuación, se colocaron los sobrenadantes en estudio, en volúmenes de 100 µl por pozo y se incubaron durante 90 min a 37°C y durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron nuevamente y en los pozos se adicionaron 100 µl del anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa y en seguida se incubaron 90 min a 37°C. Los pozos se lavaron como en los pasos anteriores y se les agregó o-fenilendiamina en volúmenes de 200 µl. La reacción se detuvo utilizando H₂SO₄ 2.5 N. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro de ELISA (Multiskan Plus MKII Flow Laboratorios) a 490 nm (25).

Determinación de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta

En un tubo Eppendorf de plástico de 1 ml, se colocaron 200 µl de la suspensión bacteriana en estudio y se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf) a 300 g durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 25 µl de PBS y se le adicionó 25 µl del anticuerpo monoclonal. Se utilizaron dos tubos controles, sustituyendo el anticuerpo monoclonal con el sobrenadante de las células SP2/0 o con el segundo anticuerpo anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (Coulter, GAMFITC). Los tubos se mezclaron a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, se lavaron dos veces (300 g durante 5 min en 500 µl de PBS). El sobrenadante se removió cuidadosamente con pipeta Pasteur después de cada lavado, mientras que el sedimento se resuspendió en 25 µl de amortiguador y 25 µl del segundo anticuerpo policlonal marcado con fluoresceína con especificidad hacia IgM de ratón, el cual se centrifugó previamente a 1 000 g por 1 min. La suspensión se homogeneizó y se incubó 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente, teniendo cuidado de mezclar cada 10 min. Finalmente, la suspensión se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en 100 µl del mismo amortiguador. En una lámina portaobjeto se esparcieron 10 µl de la suspensión, se fijaron por desecación al aire y se procedió a realizar el montaje con lámina cubreobjeto. Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon, con lámpara de mercurio de 100 watts (26). Se tomaron microfotografías con una cámara Nikon de 135 mm.

Resultados

La fusión realizada con el propósito de obtener

anticuerpos monoclonales contra *A. madurae*, arrojó un total de 672 pozos con células, de los cuales se lograron 115 con crecimiento de híbridos, y de estos solamente 8 produjeron inmunoglobulinas. De los últimos se clonaron 3, consiguiéndose 34 clonas, de las cuales 30 fueron positivas. Al reclonar, se rescataron el mismo número de clonas secretoras de inmunoglobulina. Las pruebas para determinar la clase de inmunoglobulina de los hibridomas alcanzados, indica que todas las clonas produjeron IgM (Tabla 1).

En cuanto a la especificidad de las mismas, se puede observar que las clonas presentan una gran reactividad hacia la cepa homóloga. La Figura 1 nos muestra los resultados del ELISA de las distintas clonas obtenidas. Como se puede apreciar, la mayoría de los hibridomas reaccionaron con gran intensidad con los pozos que contenían el antígeno de *A. madurae* (pozos E3-E9). Sin embargo, ocasionalmente algunos sobrenadantes se combinaron con los pozos sensibilizados con otros actinomicetos (B11), los cuales se descartaron en este estudio. En la placa también se puede notar que los sueros policlonales obtenidos directamente de los ratones inmunizados, reconocieron los antígenos homólogos con los cuales fueron inmunizados (columna 2), específicamente, anti-*N. asteroides* con el antígeno de *N. asteroides* (A2), *N. otitidis-caviarum* con el antígeno de *N. otitidis-caviarum* (B2), y así sucesivamente con *S. somaliensis* (C2), *N. brasiliensis* (D2) y *A. madurae* (E2). Por otra parte, los sobrenadantes del mieloma SP2/0 usados como controles, no identificaron a ninguno de los antígenos evaluados (1A, 1B, 1C, 1D y 1E).

Tabla 1. Caracterización de anticuerpos monoclonales frente a *Actinomadura madurae*

Clonas (#)	Clase de Inmunoglobulina				
	IgA	IgG	IgG1	IgG2b	IgM
	<i>Promedio de Lecturas (O.D.)</i>				
34	0.058	0.03	0.017	0.023	0.948
	(0.003-0.153)*	(0.04-0.073)	(0.002-0.054)	(0.0-0.065)	(0.012-2.0)

* Los números entre paréntesis indican el rango de lectura obtenido.

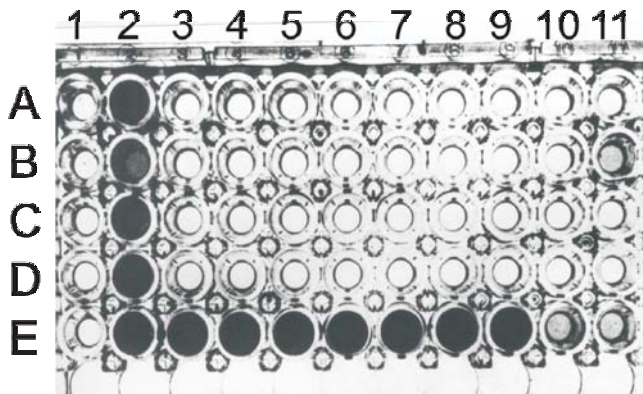


Figura 1. Especificidad de los hibridomas seleccionados. Las filas A-E se encuentran sensibilizadas con *N. asteroides* (A), *N. otitidis caviarum* (B), *S. somaliensis* (C), *N. brasiliensis* (D), y *A. madurae* (E). Los diferentes pozos se trataron con: sobrenadante del mieloma SP2/0 (1A-1E), sueros policlonales de ratones inmunizados con *N. asteroides* (2A), *N. otitidis caviarum* (2B), *S. somaliensis* (2C), *N. brasiliensis* (2D), *A. madurae* (2E), y los diferentes hibridomas obtenidos (3A-11E), los cuales muestran una especificidad dirigida esencialmente hacia *A. madurae* (3E-10E); alguno de estos evidencia reacción cruzada (11B).

La especificidad de las clonas obtenidas de animales inmunizados con *A. madurae* se corroboró por inmunofluorescencia. Los distintos híbridos fueron positivos mostrando diferentes patrones de intensidad con la cepa homóloga (Fig. 2); así, 12 sobrenadantes de los anticuerpos monoclonales contra *A. madurae* reaccionaron fuertemente con la cepa homóloga (++++ y +++), mientras que 6 lo hicieron débilmente (++ y +) y 16 fueron negativos. Por otra parte, estos anticuerpos monoclonales no reconocieron cepas de otros actinomicetos (Tabla 2).

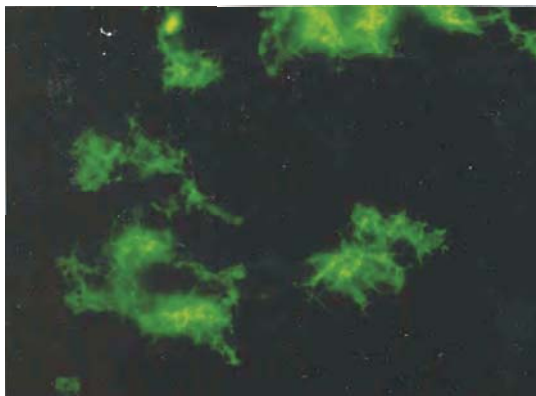


Figura 2. Inmunofluorescencia de un anticuerpo monoclonal específico para *A. madurae*.

Tabla 2. Inmunofluorescencia indirecta: especificidad de los anticuerpos monoclonales frente a *Actinomadura madurae*

Clonas (#)	<i>Actinomadura madurae</i>	Otros actinomicetos*
10	++++ **	negativa
2	+++	negativa
4	++	negativa
2	+	negativa
16	negativa	negativa

* *N. asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *N. rubra*, *N. brasiliensis*, *S. paraguayensis*, *S. somaliensis*, y *A. pelletieri*.

**Intensidad de la fluorescencia observada.

Cuando se compararon los resultados obtenidos por ELISA con los de inmunofluorescencia (Tabla 3), se observó que algunas clonas fueron francamente positivas por ELISA y negativas por inmunofluorescencia. Sin embargo, desde el punto de vista general se apreciaron semejanzas en los resultados por ambas técnicas.

Tabla 3. Clonas productoras de anticuerpos monoclonales frente a *Actinomadura madurae*

Clonas (#)	ELISA (O.D.)	Inmunofluorescencia indirecta
10	0.624 (0.182-0.912)*	++++**
2	0.856 (0.797-0.916)	+++
4	0.553 (0.404-0.876)	++
2	0.300 (0.152-0.449)	+

* Los números entre paréntesis indican el rango de lectura obtenido.

** Intensidad de la fluorescencia observada

Discusión

El presente trabajo reporta la producción de anticuerpos monoclonales frente a *A. madurae*, los cuales mostraron una gran especificidad y sensibilidad, como se evidencia por los resultados obtenidos con las pruebas de ELISA e inmunofluorescencia indirecta. Sin embargo, la técnica de ELISA reveló un mayor número de sobrenadantes con reacciones positivas contra la cepa homóloga (Fig.1), lo cual pudiera ser explicado por el tipo de antígeno utilizado. En la prueba de ELISA se usó un extracto antigénico, mientras que en la inmunofluorescencia se empleó la bacteria total. Es decir, los anticuerpos monoclonales presentes en los sobrenadantes, cuando reaccionan con el extracto antigénico manejado en el ELISA, están reconociendo determinantes antigénicos presentes tanto en la superficie como en el interior de *A. madurae*, mientras que en la inmunofluorescencia indirecta, los monoclonales reconocen únicamente los antígenos de superficie. Es interesante el hecho de que los monoclonales obtenidos fueron exclusivamente de la clase IgM. Una posible explicación para este hallazgo es que los extractos de *A. madurae* actúen de manera T-independiente, y de esta manera favorezcan la producción de IgM (27). En este sentido, debemos mencionar que otro actinomiceto, específicamente, *N. brasiliensis* es mitogénico y favorece la expansión policlonal de células B y además soslaya el requisito de células T en un sistema de producción de anticuerpos in vitro (28).

En relación a la especificidad, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las clonas aisladas reconocen determinantes antigénicos presentes en *A. madurae* y carentes en otras cepas de actinomicetos, a pesar de estar relacionados antigénicamente. Este hallazgo sugiere la posibilidad de su utilidad como herramienta diagnóstica, para la identificación de *A. madurae* presente en lesiones que clínicamente sean sospechosas de micetoma. Es imprescindible realizar estudios para evaluar la detección de *A. madurae* directamente en el tejido infectado, por medio de estos anticuerpos monoclonales y la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Es conveniente mencionar que Serrano y col. (13), en una revisión de casos de actinomicetoma en

Venezuela entre 1976 y 1986 reportaron que de 47 casos estudiados, *A. madurae* se encontró en un 42.5%, siendo el más frecuente en nuestro país de los agentes causales de actinomicetoma. Es importante destacar que, la cepa de *A. madurae* usada en el presente trabajo se aisló de un paciente, agricultor del Estado Lara, en Venezuela, quien presentaba lesiones en el pie derecho, de aproximadamente 23 años de evolución. Todos los intentos microbiológicos para aislar la cepa fallaron y solo se pudieron observar por microscopía electrónica formas L a partir de material de biopsia de tejido, las cuales fueron pasadas posteriormente a medios de cultivo, que originaron revertantes a formas bacterianas típicas, que luego se identificaron como *A. madurae* (16). En consecuencia, los anticuerpos monoclonales obtenidos pudieran ser utilizados como un método rápido, práctico y sencillo para el diagnóstico de estas infecciones. Es necesario indicar que este es el primer reporte sobre la obtención de anticuerpos monoclonales contra *A. madurae* o sus antígenos.

En resumen, empleando extractos crudos de *A. madurae* como antígeno, se obtuvieron anticuerpos monoclonales de la clase IgM que reaccionaron únicamente con dicho microorganismo. Estos resultados demuestran que los anticuerpos monoclonales pueden constituir una herramienta de gran utilidad para intentar resolver los múltiples problemas que se presentan en el estudio de los actinomicetos productores de micetoma. Sin embargo, creemos que es necesario caracterizar los determinantes antigénicos o epitopos que reconocen estos anticuerpos monoclonales, lo cual sería de gran utilidad no solo en el diagnóstico sino en el estudio de su potencial uso en protección.

Correspondencia. Prof. Antonio Velásquez-Mejía, M. Sc. e-mail: antoveme1952@yahoo.es

Referencias

1. Lichon, V., Khachemoune, A. 2006. Mycetoma: a review. *Am. J. Clin. Dermatol.* 7:315-21.
2. Fahal, A.H. 2004. Mycetoma: a thorn in the flesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98:3-11.
3. Maiti, P.K., Ray, A., Bandyopadhyay, S. 2002. Epidemiological aspects of mycetoma from a retrospective study of 264 cases in West Bengal. *Trop. Med. Int. Health* 7:788-792.
4. Develoux, M., Dieng, M.T., Kane, A., Ndiaye, B. 2003. Management of mycetoma in West-Africa. *Bull. Soc.*

- Pathol. Exot. 96:376-82.
5. Dieng, M.T., Niang, S.O., Diop, B., Ndiaye, B. 2005. Actinomycetomas in Senegal. Study of 90 cases. Bull. Soc. Pathol. Exot. 98:18-20.
 6. Denguezli, M., Kourda, M., Ghariani, N., et al. 2003. Mycetomas in central Tunisia. Ann. Dermatol. Venezol. 130:515-8.
 7. Serrano, J.A., Novoa-Montero, D. 2001. Review on human mycoses in South America. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 21:66-77.
 8. Negroni, R., López Daneri, G., Arechavala, A., Branchi, M.H., Robles, A.M. 2006. Clinical and microbiological study of mycetoma at the Muniz Hospital of Buenos Aires. Rev. Argent. Microbiol. 38:13-18
 9. López-Martínez, R., Méndez-Tovar, L. J., Lavalle, P., Welsh, O., Saul, A., Macotella-Ruiz, E. 1992. Epidemiology of mycetoma in Mexico. Gac. Méd. Méx. 128:477-81.
 10. Lacaz, C. 1981. Distribuicao geografica dos micetomas no brasil. An. Bras. Derm. 56:167-172.
 11. Castro, L.G., Belda-Junior, W., Salebian, A., Cuce, L.C. 1993. Mycetoma: a retrospective study of 41 cases in Sao Paulo, Brazil from 1978 to 1989. Mycoses 36:89-95
 12. Serrano, J.A., Sandoval, H. 2003. El micetoma. Revisión. Rev. Soc. Venezol. Microbiol. 23:70-79.
 13. Serrano, J.A., Beaman, B., Mejía, M.A., Vitoria, J.E., Zamora, R. 1988. The actinomycetoma in Venezuela: A ten year study (1976-1986). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 30:297-304.
 14. Serrano, J.A., Sandoval, H.A. 2005. Identificación y Diagnóstico de Actinomicetales Patógenos. Publ. Vicerrectorado Académ. Col. Ciencias de la Salud. Mérida, Ven. 103-120.
 15. Ispoglou, S.S., Zormpala, A., Androulaki, A., Sipsas, N.V. 2003. Madura foot due to *Actinomyces madurae* imaging appearance. Clin. Imaging 27:233-235.
 16. Díaz-Corrales, F.J., Serrano, J.A. 2000. Patogenicidad de las "formas L" de *Nocardia*. Bol. Soc. Ven. Microbiol. 20:5-9.
 17. Ritacco, F.V., Haltli, B., Janso, E., Greenstein, M., Bernan, V.S. 2003. Dereplication of *Streptomyces* soil isolates and detection of specific biosynthetic genes using an automated ribotyping instrument. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30:472-479.
 18. Ramírez-Saad, H. C. 2005. Detección y tipificación de actinomicetos patógenos basadas en técnicas moleculares. En, Identificación y Diagnóstico de Actinomicetales Patógenos. J.A. Serrano, A.H. Sandoval, eds. Publ. Vicerrectorado Académ. Col. Ciencias de la Salud. Mérida, Ven. 203-218.
 19. Bevis, B.L. 1961. Serological studies on mycobacteria, *Nocardia*, *Actinomyces* and fungi. Sabouraudia 1:154-160.
 20. Beaman, L., Beaman, B.L. 1990. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. Infect. Immun. 58:3122-128.
 21. Salinas-Carmona, M.C., Castro-Corona, M.A., Sepúlveda-Saavedra, J., Pérez, L. I., 1997. Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *N. brasiliensis*. Clin. Diag. Lab. Immunol. 4:134-137.
 22. Youmans, G.P. Karlson, A.G. 1947. Streptomycin sensitivity of tubercle bacilli: studies on recently isolated tubercle bacilli and the development of resistance to streptomycin *in vivo*. Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis. 55:529-535.
 23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
 24. Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (London) 256:495-497.
 25. Saunders, G.C. 1979. The art of solid-phase enzyme immunoassay including selected protocols. En, Immunoassays in the Clinical Laboratory. R.M. Nakamura, W.R. Dito, E.S. Tucker III, eds. Alan R. Liss Inc., New York. 99-118.
 26. Coons, A.H, Leduc, E.H. Connolly, J.M. 1955. Studies on antibody production. I: A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. J. Exp. Med. 102:49-60.
 27. Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S. Snowden, N. 2006. Clinical Immunology. Blackwell, Malden, Mass. 25-26.
 28. Ortiz-Ortiz, L., Parks, D.E., López, J.S., Weigle, W.O. 1979. B-lymphocyte activation with an extract of *Nocardia brasiliensis*. Infect. Immun. 25:627-634.