

Aplicación de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la observación de levaduras en biopsias de pacientes con esporotricosis cutánea con el uso de anticuerpos antilevaduras y antiesporas

Advantan®
Finacea® Gel

Palma-Ramos A¹, Castrillón-Rivera LE¹, Paredes-Rojas A¹, Vega-Memije ME², Arenas-Guzmán R³, Castañeda-Sánchez JI¹

Resumen

ANTECEDENTES: la esporotricosis es una infección micótica subcutánea o profunda de evolución subaguda o crónica, adquirida por inoculación traumática o por inhalación de esporas de alguna de las especies del complejo *Sporothrix schenckii*, formado por los siguientes agentes etiológicos: *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* y *S. schenckii*. Es un hongo dimórfico que aparece en la naturaleza en forma filamentosa y cuando un hospedero es infectado, el hongo desarrolla la forma de levadura. El diagnóstico de laboratorio definitivo se realiza a través del cultivo del hongo a 25°C a partir de muestras clínicas. También son de utilidad los frotis y los cortes de biopsia con tinciones de PAS o Grocott; sin embargo, en ocasiones estos recursos no son suficientes y se busca el apoyo de procedimientos inmunológicos.

OBJETIVO: obtener una técnica de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de esporotricosis cutánea con el uso de anticuerpos antilevaduras y antiesporas del grupo *Sporothrix schenckii*.

MATERIAL Y MÉTODO: estudio experimental y descriptivo en el que se usaron 10 biopsias de pacientes con diagnóstico de esporotricosis cutánea, proporcionadas por el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se realizaron tres cortes por biopsia, uno para la realización de la técnica de PAS y dos para el marcaje de inmunofluorescencia indirecta utilizando uno para IgG antilevadura y el otro para IgG antiespora hechos en conejo y luego un IgG-FITC (isotiocianato de fluoresceína) anti-IgG de conejo hecho en cabra.

RESULTADOS: en todos los casos se encontró que el anticuerpo antilevadura y el anticuerpo antiespora reconocen a las levaduras presentes en los cortes, observándose excelente definición.

CONCLUSIÓN: la técnica de inmunofluorescencia indirecta nos proporciona un método de alta afinidad, confiable y sencillo para el diagnóstico de esporotricosis cutánea.

PALABRAS CLAVE: *Sporothrix schenckii*, esporotricosis cutánea, inmunofluorescencia.

¹ Laboratorio de Immunopotenciadores, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

² Servicio de Dermatología.

³ Servicio de Micología.

Hospital General Manuel Gea González, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

Recibido: agosto 2015

Aceptado: noviembre 2015

Correspondencia

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez
jcastanedas@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como

Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Paredes-Rojas A, Vega-Memije ME y col. Aplicación de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la observación de levaduras en biopsias de pacientes con esporotricosis cutánea con el uso de anticuerpos antilevaduras y antiesporas. Dermatol Rev Mex. 2016 sep;60(5):373-380.

Dermatol Rev Mex 2016 September;60(5):373-380.

Usefulness of indirect immunofluorescence for yeasts visualization from skin biopsies from sporotrichosis patients using anti-yeast and anti-spore labeled antibodies.

Palma-Ramos A¹, Castrillón-Rivera LE¹, Paredes-Rojas A¹, Vega-Memije ME², Arenas-Guzmán R³, Castañeda-Sánchez JI¹



Abstract

BACKGROUND: Sporotrichosis is a fungal infection, acquired by traumatic inoculation or by inhalation of conidia of any of the species of *Sporothrix schenckii* complex; this complex includes: *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* and *S. schenckii*. This is a dimorphic fungus that occurs in nature in the mycelial form and when a host is infected, the fungus develops a yeast. Sporotrichosis has been classified in cutaneous and extracutaneous. Definitive laboratory diagnosis is performed by fungus culture, and sometimes by biopsy or PAS or Grocott smears; however, sometimes immunological procedures are mandatory.

OBJECTIVE: To perform indirect immunofluorescence technique for the diagnosis of cutaneous sporotrichosis with the use of antibodies anti-yeast and anti-spore of *Sporothrix schenckii* complex.

MATERIAL AND METHOD: An experimental and descriptive study in which ten biopsies from patients with diagnosis of cutaneous sporotrichosis from the Dermatology Department at Dr. Manuel Gea González General Hospital, Mexico City, were used. Three slices were made by biopsy, one for the PAS technique and two for indirect immunofluorescence for IgG anti-yeast and IgG anti-spore and then an IgG-FITC (fluorescein isotiocyanate) made in goat anti-IgG rabbit.

RESULTS: In all cases we found both the anti-yeast antibody and the anti-spore antibody recognized yeasts with excellent definition.

CONCLUSION: The indirect immunofluorescence technique provides a method of high affinity, reliable and simple for the diagnosis of cutaneous sporotrichosis.

KEYWORDS: *Sporothrix schenckii*, cutaneous sporotrichosis, immunofluorescence

¹ Laboratorio de Immunopotenciadores, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

² Servicio de Dermatología.

³ Servicio de Micología.

Hospital General Manuel Gea González, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

Correspondence

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez
jcastanedas@correo.xoc.uam.mx

Advantan® Finacea® Gel

ANTECEDENTES

La esporotricosis es una infección micótica de evolución subaguda o crónica, adquirida por inoculación traumática o por inhalación de esporas de alguna de las especies del complejo *Sporothrix schenckii*. La enfermedad puede afectar a humanos y animales. Se caracteriza por lesiones nodulares en la piel y el tejido subcutáneo. Con frecuencia sigue el trayecto de los vasos linfáticos y ocasionalmente otros órganos, huesos y articulaciones. Se localiza principalmente en la cara y las extremidades.^{1,2} Los agentes etiológicos que forman parte del complejo *Sporothrix schenckii* son: *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* y *S. schenckii*; corresponde a un hongo dimórfico que aparece en la naturaleza en forma micelial (o fase infectante) y cuando un hospedero es infectado, el hongo desarrolla la forma de levadura (o fase parasitaria).³⁻⁶ La vía de entrada en esporotricosis cutánea es a través de traumatismos o escoriaciones hechos con material contaminado, que afecta principalmente a campesinos, jardineros, floristas, amas de casa, carpinteros, mineros, alfareros y laboratoristas; se considera una enfermedad ocupacional; las principales fuentes de infección son la madera, la paja y el zacate. También puede adquirirse mediante animales que actúan como vectores indirectos o pasivos.⁷

La esporotricosis se clasifica desde el punto de vista clínico en cutánea y extracutánea. Su manifestación clínica más frecuente es la cutánea, ya sea linfangítica (70 a 75%) o fija (20 a 30%) y la forma diseminada (5%) es menos frecuente.⁸

El diagnóstico de laboratorio definitivo se realiza a través del cultivo del hongo a partir de muestras clínicas. En el estudio histopatológico se encuentra hiperplasia pseudoepiteliomatosa con formación de microabscesos; se puede ver una imagen granulomatosa con polimorfonucleares, células epitelioides y células gigantes

tipo Langerhans. Se describe una imagen sifiloide constituida por células plasmáticas, linfocitos y fibroblastos. En ocasiones se observan formas levaduriformes en forma de navicillas o de cigarro de 3 a 5 μm , cuerpos asteroides que no son exclusivos de la esporotricosis,¹ éstas se visualizan mejor con tinción de PAS o Grocott; sin embargo, en ocasiones estos recursos no son suficientes y se busca el apoyo de procedimientos inmunológicos (aglutinación de células levaduriformes en tubo, aglutinación de partículas de látex, inmunodifusión, inmunofluorescencia).⁹

La inmunofluorescencia indirecta se utilizó anteriormente para la observación y evidencia de blastoconidios del complejo *Sporothrix schenckii* en tejidos, porque las técnicas de anticuerpos fluorescentes son altamente específicas en comparación con las tinciones tradicionales.¹⁰⁻¹³

El objetivo de este estudio es obtener una técnica de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de esporotricosis cutánea con el uso de anticuerpos antilevadura y antiesporas del grupo *Sporothrix schenckii*.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de esporas

Se sembró la cepa de *Sporothrix schenckii*, proporcionada por el Hospital General Dr. Manuel Gea González, en agar Sabouraud y se incubó durante seis meses a 25°C.

Las esporas de *Sporothrix schenckii* se sembraron en agar BHI por 48 horas a 37°C para obtener colonias de levaduras.

Se preparó una suspensión de esporas y una de levaduras, cada una en solución salina estéril hasta una concentración equivalente al tubo núm. 3 del nefelómetro de McFarland (900x10⁶ UFC/mL).



La suspensión de esporas se trató en autoclave a 15 lb de presión, 121°C, durante 15 minutos, para la inactivación de éstas.

En el caso de las levaduras la suspensión se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y la biomasa se resuspendió en 5 mL de formalina (formol 4%) durante 2.5 horas. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y la biomasa se resuspendió en solución salina estéril.

Obtención de anticuerpos antiesporas y antilevaduras de *Sporothrix schenckii*

Se utilizaron conejos adultos Nueva Zelanda y se realizó el protocolo de inmunización que se muestra en el Cuadro 1.

A partir del suero de los animales inmunizados se purificaron las gammaglobulinas con sulfato de amonio a una concentración final de 33%, se dializó en solución salina de boratos y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

Titulación de anticuerpos por técnica de aglutinación¹⁴

Se agregaron 0.25 mL de TBS-gel en 10 tubos, se agregaron 0.25 mL de suero al tubo 1 y se

Cuadro 1. Protocolo de inmunización para esporas y levaduras

Núm. de inyección	Tiempo (día)	Dosis (mL)	Vía
1	0	0.5	Intravenosa
2	4	1.0	Intravenosa
3	8	2.0	Intravenosa
4	12	3.0	Intravenosa
Toma de muestra	18		
5	22	3.0	Intravenosa
Sacrificio			

realizaron diluciones al doble, dejando al tubo 10 como testigo. Se adicionaron a todos los tubos 0.25 mL de la suspensión (levaduras o esporas) y se agitaron. Se colocaron a 37°C durante 3 horas y se refrigeraron durante 24 horas. El título del suero en cada caso correspondió a la dilución mayor en la que se observa aglutinación.

Biopsias

Se analizaron 10 biopsias de piel provenientes de pacientes con diagnóstico de esporotricosis cutánea, proporcionadas por el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se realizaron tres cortes por biopsia, uno para la realización de la técnica de PAS y dos para el marcaje de inmunofluorescencia indirecta utilizando uno para IgG antilevadura y el otro para IgG antiespora hechos en conejo y luego un IgG-FITC (isotiocianato de fluoresceína) anti-IgG de conejo hecho en cabra.

Técnica de ácido peryódico-Schiff (PAS)¹⁵

Desparafinar y tratar con ácido peryódico a 0.6% durante 10 minutos; lavar, secar, agregar reactivo de Schiff por 15 minutos en la oscuridad, después lavar con agua sulfurosa y con agua destilada. Colorear con hematoxilina de Harris uno o dos minutos y luego lavar, adicionar amarillo de metilo durante tres minutos, lavar con agua acidulada y destilada. Deshidratar y montar.

Las estructuras y compuestos PAS positivos (polisacáridos) se observan de color rosa, los núcleos azules y el citoplasma amarillo.

Técnica de inmunofluorescencia indirecta¹⁶

1. Desparafinar
2. Agregar PBS (pH 7.4) durante cinco minutos.
3. Bloquear con PBS gelatina (0.05% pH 7.4) durante cinco minutos.

Advantan® Finacea® Gel

4. Agregar el anticuerpo primario (antilevadura o antiespora hechos en conejo), diluido 1:50 e incubar en cámara húmeda a 37°C durante 2 horas.
5. Enjuagar con amortiguador PBS pH 7.4 durante cinco minutos.
6. Agregar el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo hecho en cabra marcado con FITC por Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:100 durante 2 horas en cámara húmeda a 37°C y en oscuridad.
7. Lavar con PBS y montar en PBS glicerol diluido (9:1).
8. Colocar un cubreobjetos.
9. Observar en microscopio de fluorescencia.

Análisis estadístico

Las muestras positivas de la tinción de inmunofluorescencia indirecta con el suero antiespora y con el suero antilevadura se trataron matemáticamente para el cálculo de sensibilidad utilizando la siguiente fórmula:

$$S = \frac{VP}{(VP+FN)} \times 100$$

Donde S: sensibilidad, VP: verdaderos positivos, FN: falsos negativos.

Valor de p binomial. Para establecer la confiabilidad del método, los valores positivos se trataron para el cálculo de p binomial usando la siguiente fórmula:

$$P^* = \frac{[n! / k!(n-k)!] p^k q^{(n-k)}}{1}$$

RESULTADOS

Para la obtención de esporas se sembró *Sporothrix schenckii* en agar Sabouraud y se incubó durante seis meses a 25°C, se aislaron colonias

membranosas de aspecto céreo, color marrón claro y finamente radiadas, más tarde se hicieron negras con centro plegado (Figura 1A); las esporas de estos cultivos las observamos en una preparación en fresco (Figura 1C).

Para la obtención de levaduras se sembraron esporas de *Sporothrix schenckii* en agar BHI por 48 horas a 37°C, con crecimiento de colonias cremosas, color castaño claro (Figura 1B), microscópicamente se observaron levaduras en forma de puro o navecilla de 3 a 5 mm de diámetro (Figura 1D).

Para la obtención de los anticuerpos se inmunizaron conejos con levaduras y con esporas de *Sporothrix schenckii*, se purificaron y se cuantificaron las concentraciones de proteínas mediante la técnica de Lowry. Los títulos de anticuerpos se determinaron por la técnica de aglutinación, los resultados fueron los siguientes: en ambos sueros (levaduras y esporas) se determinaron títulos de anticuerpos de 1:128 (para ambos casos) y se determinaron concentraciones de proteínas de 13.75 mg/mL para el suero antilevaduras y de

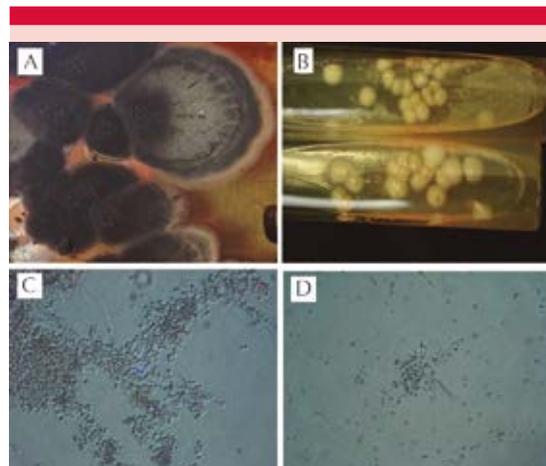


Figura 1. Crecimiento macro y microscópico de *Sporothrix schenckii* en agar Sabouraud. **A.** Fase micelial. **B.** Fase levaduriforme. **C.** Frotis de esporas 40X. **D.** Frotis de levaduras 40X.



16.17 mg/mL para el suero antiesporas (Cuadro 2).

Se probaron los anticuerpos antilevaduras y antiesporas de *Sporothrix schenckii* en frotis de levaduras y de esporas utilizando como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en cabra marcado con FITC (Figura 2).

Para el montaje de la técnica de inmunofluorescencia indirecta se utilizaron cortes histológicos de 10 pacientes ya diagnosticados con esporotricosis cutánea por hongos del grupo de *Sporothrix schenckii*, mediante la reacción de PAS (Figura 3).

En dos cortes de cada paciente se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos antilevaduras en uno y antiesporas en otro, hechos en conejo, utilizando anti-IgG de conejo marcado con FITC hecho

Cuadro 2. Concentración de proteínas purificadas de los sueros de conejos y título de anticuerpos, antilevaduras y antiesporas

	Concentración de proteínas en mg/mL	Título de anticuerpos (IgG de conejo)
Antilevaduras	13.75	1:128
Antiesporas	16.17	1:128

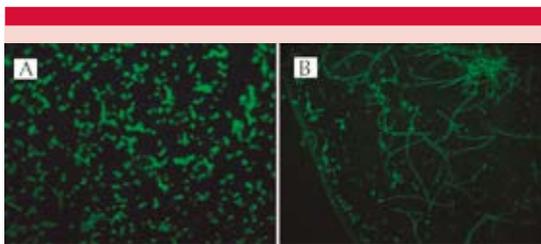


Figura 2. Marcaje por inmunofluorescencia indirecta de *Sporothrix schenckii* con antilevadura hecho en conejo y con anti-IgG de conejo hecho en cabra marcado con FITC. **A.** Levaduras. **B.** Esporas.

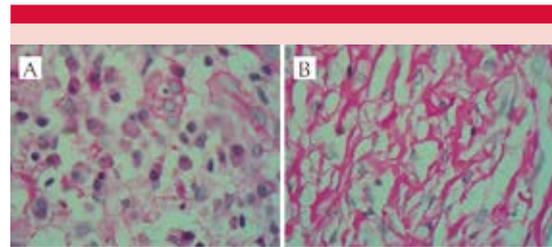


Figura 3. Corte histológico con la reacción de PAS. **A.** Paciente 1. **B.** Paciente 2.

en cabra como anticuerpo secundario. De las 10 biopsias de pacientes con esporotricosis se encontró marca fluorescente con el anticuerpo antilevadura y con el anticuerpo antiespora, lo que demuestra que ambos anticuerpos reconocen a levaduras de *S. schenckii* (Figura 4).

En todos los casos estudiados, que ya se habían diagnosticado con esporotricosis cutánea y mostrado la existencia de levaduras por la técnica de PAS, se encontró que los anticuerpos antilevaduras y antiesporas reconocieron a las levaduras presentes en los cortes, observándose excelente definición.

DISCUSIÓN

Las técnicas de anticuerpos fluorescentes son altamente específicas en comparación con las tinciones tradicionales. De acuerdo con Kaplan y González-Ochoa, los anticuerpos fluorescentes pueden usarse como un método rápido para la demostración del grupo *Sporothrix schenckii* en improntas del exudado de las lesiones, ya que encontraron 88% de positividad.¹⁷ Kaplan e Ivens, al utilizar la inmunofluorescencia, observaron escasas estructuras fúngicas en material clínico humano, fácilmente reconocibles.¹⁸ A través de este estudio se demostró que además del cultivo, la intradermorreacción y la histopatología, la inmunofluorescencia indirecta representa otro recurso valioso para determinar la existencia del parásito en los tejidos infectados.¹⁹

Advantan® Finacea® Gel

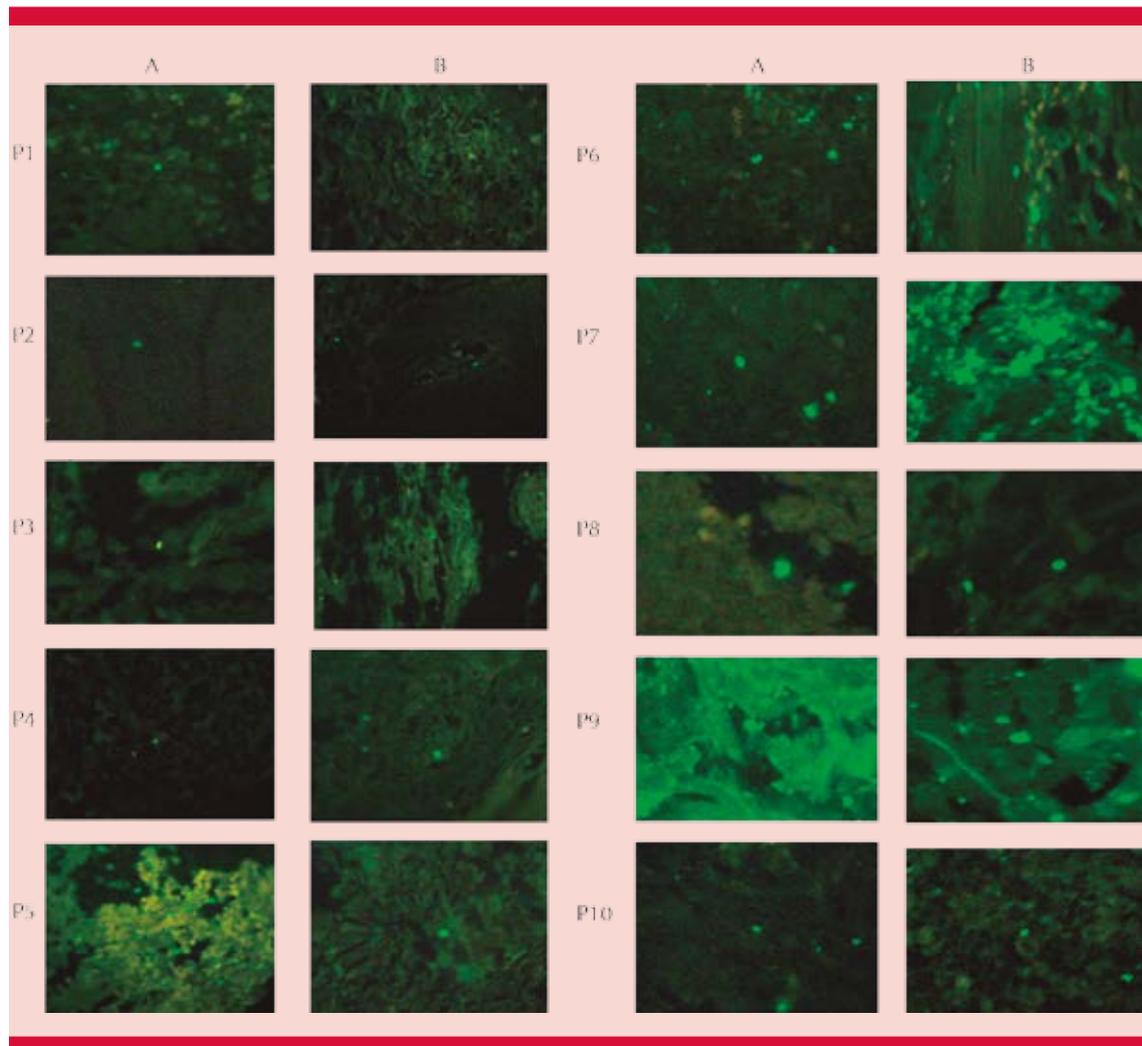


Figura 4. Comparación de la marca de levaduras de *Sporothrix schenckii* en tejido con antilevadura y con antiesporas hechos en conejo y con anti-IgG de conejo hecho en cabra marcado con FITC. **A.** Anticuerpo antilevadura. **B.** Anticuerpo antiespora. n=10. Valor de p binomial: 0.00097.

En nuestro estudio comparamos anticuerpos hechos contra esporas y anticuerpos hechos contra levaduras de *Sporothrix schenckii* y encontramos resultados similares al observar la fluorescencia existente en los marcajes de los cortes en cada paciente, con fluorescencia y buena definición en todos los marcajes efectuados. De manera que podemos decir que encontramos 100% de marca para ambos

anticuerpos probados (equivalente al 100% de sensibilidad), lo que demuestra que las levaduras y las esporas de *Sporothrix schenckii* tienen determinantes antigénicos compartidos.

Esta técnica fue sensible (100% de sensibilidad), lo que permite establecer que es altamente confiable (valor de p binomial 0.00097) y recomendable para el diagnóstico de esporotricosis,



cuando se dispone de los anticuerpos necesarios y de un microscopio de fluorescencia.

CONCLUSIÓN

La técnica de inmunofluorescencia indirecta proporciona un método de alta afinidad, confiable y sencillo para la observación de levaduras en biopsias de pacientes con diagnóstico de esporotricosis cutánea.

Este trabajo fue financiado con fondos del PRO-DEP/SEP: 34611549/915056.

REFERENCIAS

- Hernández HF. Esporotricosis. 2013. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/esporotricosis.html>. [consulta: miércoles, 24 de abril del 2013].
- Vásquez ME, Arenas R, Padilla DC. Sporotrichosis. Clin Dermatol 2012;30:437-443.
- Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana* three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol 2007;45:3198-3206.
- Marimon R, Cano J, Gené J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: A rare fungus from clinical origin. Med Mycol 2008;46:621-625.
- Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:732-734.
- Marimon R, Cano J, Gené J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol 2007;45:198-206.
- Venadero AF, Orellana AAR, Castillón ASJ, Bonifaz A, Padilla DMC. Esporotricosis linfangítica. A propósito de diferentes alternativas de tratamiento. Dermatol Rev Mex 2010;54:145-149.
- Padilla DMC, Navarrete FG, Siu MCM. Esporotricosis linfangítica con nódulos satélites en el chancro de inoculación. Rev Cent Dermatol Pascua 2008;17:54-57.
- Padilla DMC, Siordia ZSP, Santa CJN. Esporotricosis con involución espontánea. Dermatol Rev Mex 2007;51:14-19.
- Arenas R, Miller D, Campos MP. Epidemiological data and molecular characterization (mtDNA) of *Sporothrix schenckii* in 13 cases from Mexico. Int J Dermatol 2007;46:177-179.
- Carrada BT. Esporotricosis facial en los niños: diagnóstico clínico y de laboratorio, tratamiento y revisión. Bol Med Hosp Infant Mex 2005;62:207-213.
- Espinosa A, Hernández F, Lavalle P. Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. evaluación clínica y de laboratorio. Gac Med Mex 2001;137:111-116.
- Arango AM, Castañeda Del GE. Micosis humanas, procedimientos diagnósticos, exámenes directos. 2ª ed. Colombia: Instituto Nacional de Salud, Corporación para Investigaciones Biológicas, 2003;56-59.
- Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. Tratado de Microbiología. 4ª ed. México: Salvat, 1996;256-257.
- Spannhof L. Hidratos de carbono: Histoquímica práctica. Gustav Fisher Verlag Jena, 1964;17-43.
- Palma RA, Castrillón RL, Pizaña CA, Vega MM y col. Subpoblaciones de linfocitos T en el micetoma. Dermatología Rev Mex 2007;51:212-218.
- Kaplan W, González OA. Applications of the fluorescence antibody technique to the rapid diagnosis of sporotrichosis. J Lab Clin Med 1963;62:835-841.
- Kaplan W, Ivens S. Fluorescent antibody staining of *Sporothrix schenckii* in cultures and clinical materials. J Invest Dermatol 1960;35:151-159.
- Espinosa TA, Hernández HF, Lavalle P, Barba RJ, López MR. Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio. Gac Med Méx 2001;137:111-116.