
Diagnóstico serológico de la esporotricosis mediante el empleo del antígeno de micelio de *Sporothrix schenckii sensu stricto*.

Primavera Alvarado¹, Ana Ostos¹, Nohelys Franquíz¹, Antonio Roschman-González², Edgar A. Zambrano³ y Mireya Mendoza¹.

¹Laboratorio de Micología, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

²Centro de Microscopía Electrónica, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

³Laboratorio de Bioquímica de Parásitos, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: *Sporothrix schenckii sensu stricto*, ELISA, esporotricosis.

Resumen. En este estudio se desarrolló y se evaluó el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), para la detección de anticuerpos en sueros de pacientes con esporotricosis, para lo cual se empleó un antígeno crudo de *Sporothrix schenckii sensu stricto* obtenido a partir de la forma micelial. Los sueros positivos para esporotricosis fueron ensayados por otras técnicas serológicas: inmunodifusión doble (IDD) y contraelectroforesis (CIE). El ensayo fue validado utilizando sueros de otras patologías como histoplasmosis, paracoccidioidomicosis, tuberculosis, leishmaniasis, lupus y sueros de individuos sanos como controles negativos. Se encontró una especificidad de 100 % con las técnicas utilizadas y una sensibilidad del antígeno de *S. schenckii sensu stricto*, por encima del 98% para IDD, CIE y ELISA. Estos resultados demuestran la alta sensibilidad y especificidad del antígeno de *S. schenckii sensu stricto*, para el diagnóstico de la esporotricosis, empleando las técnicas de IDD, CIE y ELISA. Los resultados sugieren, que este antígeno podría ser usado en conjunto con otras pruebas convencionales para el diagnóstico diferencial y puede ser útil para monitorizar la evolución de la enfermedad y respuesta al tratamiento.

Serological diagnosis of sporotrichosis using an antigen of *Sporothrix schenckii sensu stricto* mycelium.

Invest Clin 2015; 56(2): 111 - 122

Keywords: *Sporothrix schenckii sensu stricto*, ELISA, sporotrichosis.

Abstract. We developed and analyzed an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in order to detect antibodies in sera from sporotrichosis patients. We used a crude antigen of *Sporothrix schenckii sensu stricto*, obtained from the mycelial phase of the fungi. Positive sera were analyzed by other serological techniques such as double immunodiffusion (IGG) and counter-immunoelectrophoresis (CIE). The assay was validated by using sera from patients with other pathologies such as: histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, tuberculosis, leishmaniasis, lupus and healthy individuals as negative controls. For the *Sporothrix schenckii sensu stricto* antigen, we found a 100% of specificity by every technique and sensitivity higher than 98% with IDD, CIE and ELISA. Our results show a high sensitivity and specificity for the *Sporothrix schenckii sensu stricto* antigen, so it can be used for IDD, CIE and ELISA. The results suggest that this antigen could be used in conjunction with other conventional tests for differential diagnosis and may be useful for monitoring the disease progression and response to treatment.

Recibido: 24-04-2014 Aceptado: 29-01-2015

INTRODUCCIÓN

La esporotricosis es una micosis subcutánea de distribución mundial, que afecta a humanos y animales, producida por especies del complejo *Sporothrix schenckii* formado por cinco especies de interés clínico: *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. luriei*, *S. mexicana* and *S. schenckii sensu stricto* (1, 2). El hongo principalmente se desarrolla en la tierra, restos vegetales y plantas. La micosis, usualmente es adquirida por inoculación traumática del hongo dentro del tejido subcutáneo (3). La esporotricosis es frecuente en América Latina, por la prevalencia de un clima tropical con suelos de alto contenido orgánico y se desarrolla en climas húmedos, con temperaturas desde 10 a 28°C. Se ha considerado una enfermedad de tipo ocupacional, presentándose sobre todo en campesinos, veterinarios, floristas y

otros (3-5). En la última década, la incidencia de la esporotricosis ha aumentado en las zonas tropicales y áreas subtropicales de Brasil, en particular en el Estado de Río de Janeiro, con la aparición de una epidemia relacionada con la transmisión zoonótica de gatos a humanos (6, 7). Este aumento en el número de casos en los gatos, fue seguido por un incremento en el número de reportes en humanos, lo que constituye un grave problema de salud pública (6, 8, 9). En Venezuela se han reportado desde 1984 hasta el 2010 alrededor de 220 casos, lo que corresponde a un 25,9% y más del 70% de los mismos ha sido reportado en el área de la Gran Caracas (10).

El diagnóstico de la esporotricosis está basado en la realización del examen directo, tinciones y cultivo micológico en Sabouraud dextrosa agar. Sin embargo, se han desarrollado inmunoensayos para el diagnósti-

co de las micosis, logrando así la detección de anticuerpos en muestras de sueros de pacientes con paracoccidioidomicosis (11-13), histoplasmosis (14, 15), cromomycosis (16, 17), candidiasis (18, 19) y esporotricosis (20, 21).

Han sido elaboradas diversas preparaciones de antígenos del complejo *Sporothrix schenckii* (antígenos de pared celular y metabólicos) en búsqueda de componentes específicos, para ser utilizados en técnicas de inmunodiagnóstico de alta especificidad y sensibilidad con el objeto de lograr una valiosa ayuda en la orientación diagnóstica (22, 23). El principal antígeno de levadura de la superficie celular es el péptido péptidos rhamnomanan, el cual, aparentemente es el componente responsable de la reactividad cruzada en las pruebas serológicas (22). Por otro lado, como antígeno metabólico se reportó el antígeno de 55 kDa sin reactividad cruzada para sueros de pacientes con otras micosis (23).

Con respecto al serodiagnóstico con antígenos específicos, de las diferentes especies del complejo *Sporothrix* spp, pocos son los trabajos reportados hasta el momento. Sin embargo, se describe el trabajo de Almeida-Paes y col. (24), donde se utilizó antígenos libres de células de *S. brasiliensis* y se identificó una proteína inmunodominante de 85 kDa, la cual puede ser usada como antígeno de diagnóstico. Por otra parte, Fernandes y col. (25), realizaron un estudio comparativo sobre las proteínas de secreción, inmunogenicidad y virulencia con aislados de *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. schenckii*, y encontraron moléculas de 46 y 60-kDa comúnmente secretadas por las tres especies y que podrían estar relacionadas con los perfiles de virulencia. Recientemente, Ruiz-Baca y col. (26) detectaron dos antígenos inmunorreactivos de la pared celular en la fase de levadura, un antígeno de 60kDa (gp60) para *S. brasiliensis* y otro de

70 kDa (gp70), para *S. globosa* los cuales mostraron alta sensibilidad y especificidad.

El presente trabajo, tuvo como objetivo comparar la sensibilidad y especificidad del serodiagnóstico de esporotricosis, utilizando el ensayo de ELISA, Inmunodifusión doble (IDD) y conrainmunolectroforesis (CIE) con el antígeno crudo de *Sporothrix schenckii sensu stricto*, producido a partir de la fase micelial del hongo, el cual ha sido previamente caracterizado (23).

MATERIAL Y MÉTODOS

Antígeno crudo de *Sporothrix schenckii sensu stricto*

Se utilizó la cepa 4526 de *Sporothrix schenckii sensu stricto* (27). El antígeno fue preparado a partir de la fase micelial, siguiendo la metodología de Mendoza y col. (23). La cepa fue mantenida en Sabouraud dextrosa agar (10 g de peptona, 20 g de dextrosa, 15 g de agar, 1000 mL de agua destilada, pH 6,5 y adicionalmente 150 mg de cloranfenicol) a temperatura ambiente. Posteriormente, fue inoculada en fiolas que contenían caldo Sabouraud dextrosa (10 g de peptona, 20 g de dextrosa, 1000 mL de agua destilada, pH 6,5 y 150 mg de cloranfenicol), cultivada por 7 días. A continuación, la cepa fue subcultivada en fermentador (Bioflo IV) por 20 días bajo condiciones constantes de temperatura (28°C), y agitación a 100 rpm. Luego, el sobrenadante del cultivo fue filtrado por membranas de Millipore de 0,45 μ m, dializado contra agua destilada a 4°C por 3 días y liofilizado. El antígeno deshidratado se disolvió con agua bidestilada y se estimó la concentración de proteínas por el método de Lowry (28). Para cada ensayo serológico, se estandarizó la concentración del antígeno a partir de la muestra original, y se enfrentó con sueros de esporotricosis y sueros de otras patologías.

Sueros de pacientes

Bajo la previa aprobación del protocolo de trabajo por el comité de Bioética del Instituto Autónomo de Biomedicina, se utilizaron veinticinco sueros de pacientes positivos para esporotricosis (10 femeninos y 15 masculinos). El diagnóstico de la esporotricosis se llevó a cabo por cultivos en Sabouraud dextrosa agar con antibiótico a 28°C, reversión del micelio a levadura en el medio de cultivo infusión cerebro corazón agar a 37°C, para comprobar su dimorfismo y observación de la morfología macroscópica y microscópica de las colonias. Posteriormente, estos aislados fueron identificados por estudios de biología molecular (27).

Las formas clínicas en los pacientes estudiados fueron: esporotricosis cutánea fija (24%) y cutánea linfagítica (76%). Fue examinado un total de 183 sueros heterólogos, histoplasmosis (n=49), paracoccidiodomicosis (n= 50), leishmaniasis (n=30) tuberculosis (n=30) y lupus (n=24). También, se evaluaron muestras de sueros de individuos sanos, donadas por el Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital (n= 50) como controles negativos.

Por otro lado, se utilizaron sueros de animales de experimentación como controles positivos. Los antisueros de conejo Anti-*S. schenckii*: Ss 99927, Ss81297, fueron producidos previamente en el Laboratorio de Micología del Servicio Autónomo del Instituto de Biomedicina del Hospital Vargas de Caracas-Venezuela (29).

Ensayos de Inmunodifusión doble (IDD)

Se empleó la técnica inmunológica de Ouchterlony (30), en la cual se utilizó una concentración del antígeno de *S. schenckii sensu stricto* de 25 mg/mL, colocando 6 a 10 μ L del antígeno (2 mm de diámetro del pozo) y 15 a 20 μ L del suero en cada pozo (5 mm de diámetro del pozo). Se evaluó el antígeno contra sueros de pacientes positivos para esporotricosis y otras patologías, a

fin de observar la reactividad cruzada. Para evaluar la especificidad de la técnica, el antígeno fue enfrentado contra sueros de individuos sanos.

Ensayo de contrainmunolectroforesis (CIE)

Se utilizó la técnica Electro-inmunodifusión (30), la cual se basó en enfrentar sueros de pacientes positivos para esporotricosis y sueros de otras patologías, para observar la reactividad cruzada. Se utilizó el antígeno de *S. schenckii sensu stricto* a la concentración de 25 mg/mL y se colocaron 6 a 10 μ L del antígeno (orificio de 2 mm de diámetro) y 15 a 20 μ L del suero (orificios de 5 mm de diámetro) por pozo. Se colocaron las láminas en la cámara para CIE, con el Buffer Tris-CH₃COOH 0,1 M pH 8,15 y se aplicó corriente de 100 voltios por 30 min. Para evaluar la especificidad de la técnica, el antígeno fue enfrentado contra sueros de individuos sanos.

Ensayo de ELISA

Se llevó a cabo el ensayo de ELISA, siguiendo el protocolo previamente descrito en la literatura (14, 21), con algunas modificaciones. Se emplearon placas de 96 pozos de Poliestireno para la sensibilización del antígeno, se dispensó 1 μ g/mL del antígeno por pozo en 100 μ L de buffer PBS (10 mM de Buffer fosfato salino). Se incubó por 1 h a 37°C y luego se dejó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se lavó la placa 3 veces con buffer de lavado PBST (PBS 10 mM, 0,1% Tween20 pH 7,3), por 5 min cada lavado. Se bloqueó con 200 μ L de 5% p/v buffer de bloqueo (leche descremada en PBST) por 2 h a 37°C. Las placas fueron lavadas 3 veces con el buffer PBST por 5 min cada lavado. Las muestras de suero de pacientes fueron añadidas por duplicado en cada pozo (100 μ L) a una dilución de 1:500 en buffer de lavado (PBST) y la placa se incubó por 1 h a 37°C. Después, se

procedió al lavado con PBST por 3 veces. Las placas fueron incubadas a 37°C por 1 h, con 100 μ L del anticuerpo secundario IgG conjugado a peroxidasa (Dako Po214, Denmark), diluido en buffer de bloqueo, utilizando la dilución recomendada por el fabricante (1:8000) en cada pozo. Se lavó la placa 3 veces con PBST y finalmente se desarrolló la reacción con 0,4 mg/mL de diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD) en 0,01 M de buffer de citrato de sodio pH 5,5 y se adicionó 0,04% v/v de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% para el momento del uso (100 μ L por pozo). Se dejó la placa 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con 50 μ L de HCl 3M. Las absorbancias fueron medidas en un lector de ELISA (BT 2000 Microkinetics Reader, Biotek Instruments, Inc., EE.UU), a una longitud de onda de 490 nm. El punto de corte, fue establecido como la media de la absorbancia más tres desviaciones estándar de los controles negativos.

Análisis estadístico

Para evaluar los inmunoensayos (IDD, CIE y ELISA) se determinaron las variables cuantitativas clásicas: Sensibilidad y Especificidad en cada uno, con Indicadores que

oscilaron entre 0 y 100%. Luego, con el fin de establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos para estas variables, se empleó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2), con una confianza de 95% (significancia = 0,05) haciendo uso del programa Statistica, versión 8.0.

El rendimiento de la prueba de ELISA, fue estimado mediante un análisis por curva de rendimiento diagnóstico o curva ROC. (Receiver-Operating-Characteristic) con el programa XLSTAT 2013. En este análisis, se determinó el área bajo la curva (AUC) que puede poseer un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico confiable y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminatoria diagnóstica (31).

RESULTADOS

Inmunodifusión doble (IDD)

En todos los ensayos de IDD, se obtuvo formación de bandas precipitantes con los sueros controles de conejo, para comprobar la reactividad del antígeno de *S. schenckii sensu stricto*. Se obtuvieron bandas precipitantes con los 25 sueros de pacientes positivos para esporotricosis, lo que representa un 100% de positividad (Fig. 1). No se en-

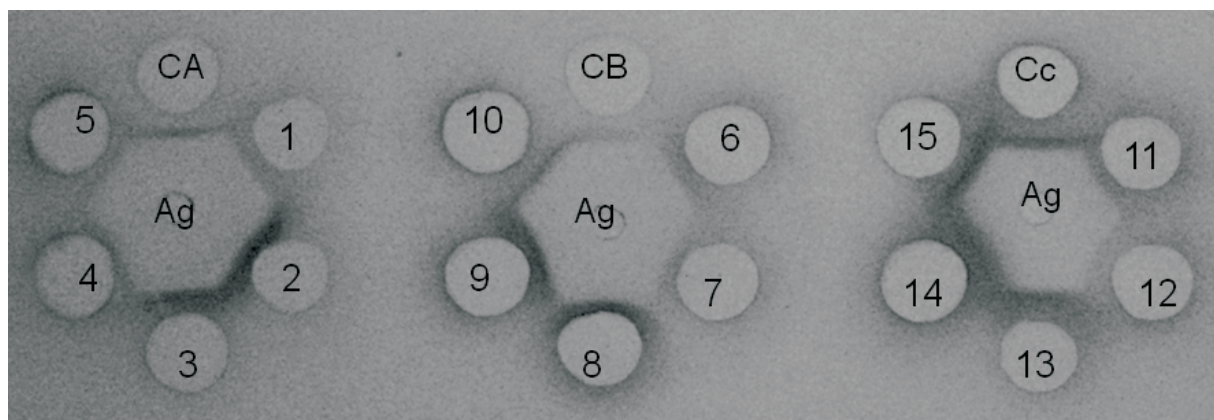


Fig. 1. Ensayo de inmunodifusión doble con el empleo del antígeno crudo de *S. schenckii sensu stricto* y sueros de pacientes con esporotricosis. CA: Suero control 99927, CB: Suero control 81297, Cc: Suero control C. Ag: Antígeno crudo de *S. schenckii sensu stricto*. 1 a 15: Diferentes sueros de pacientes.

contró reacción cruzada entre el antígeno de *S. schenckii sensu stricto* y sueros heterólogos de *H. capsulatum* y *P. brasiliensis*, tuberculosis, leishmaniasis y lupus. Al retar el antígeno de *S. schenckii sensu stricto* con sueros de individuos sanos, no se obtuvieron bandas precipitantes con los 50 sueros evaluados, lo que representa un 100% de especificidad.

Contrainmunolectroforesis (CIE)

En todos los ensayos de CIE realizados, se obtuvo formación de bandas precipitantes con los sueros controles de conejo, utilizados para comprobar la reactividad del antígeno de *S. schenckii sensu stricto*. Los 25 sueros de pacientes positivos para esporotricosis, fueron evaluados por la técnica, mostrando bandas precipitantes, lo cual representa 100% de positividad (Fig. 2). No se obtuvo reacción cruzada con el antígeno *S. schenckii sensu stricto*, frente a sueros heterólogos de histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, tuberculosis, y leishmaniasis. Sin embargo, se encontraron falsos positivos con el antígeno de *S. schenckii sensu stricto* y los sueros de pacientes con lupus. La técnica de CIE, resultó tener una especificidad del 100%, al no formar bandas de precipitina con ninguno de los 50 sueros de individuos sanos.

Ensayo de ELISA

El punto de corte, fue establecido como la media de la absorbancia más tres desviaciones estándar de los controles negativos. Las muestras con absorbancias mayores a 0,736, fueron consideradas positivas. En la Fig. 3, se observa que todos los sueros de pacientes con esporotricosis se encontraron por encima del punto de corte, lo que representa un 100% de sensibilidad. No se observó reacción cruzada con los sueros heterólogos de histoplasmosis, tuberculosis y leishmaniasis. Se observaron falsos positivos con los sueros de pacientes con para-

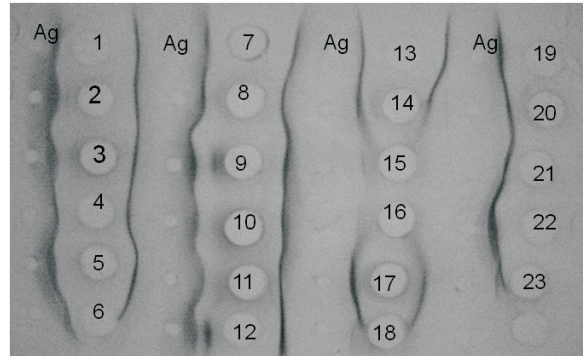


Fig. 2. Ensayo de contraelectroforesis con el empleo del antígeno crudo de *S. schenckii sensu stricto* contra sueros de pacientes con esporotricosis. Ag: Antígeno crudo de *S. schenckii sensu stricto*. 1 a 22: Diferentes sueros de pacientes. 23: Suero control.

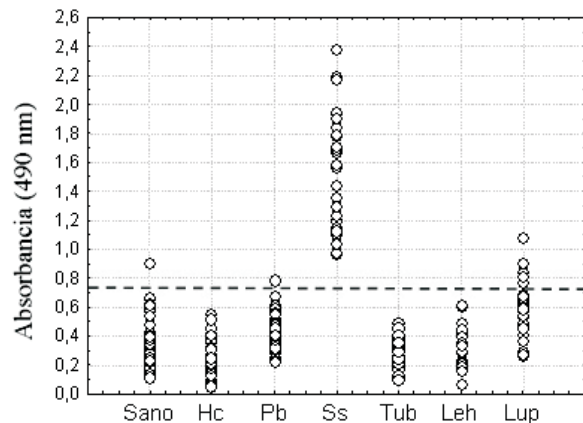


Fig. 3. Detección de la presencia de anticuerpos en sueros de pacientes con esporotricosis y otras patologías al utilizar el antígeno crudo de *S. schenckii sensu stricto* y la técnica de ELISA. La línea horizontal muestra el punto de corte 0,736. Sano: sueros de individuos sanos, Hc: sueros de *H. capsulatum*, Pb: sueros de *P. brasiliensis*, Ss: sueros de esporotricosis, Tub: sueros de tuberculosis; Leh: sueros de leishmaniasis; Lup: sueros de lupus.

coccidioidomicosis (1/50) y con los sueros de lupus (5/24) (Tabla I).

Comparación de técnicas serológicas

Al utilizar el antígeno de *S. schenckii sensu stricto*, con las diferentes técnicas (IDD, CIE, ELISA), se obtuvo una especificidad de 100% para IDD y CIE y del 98% para el Ensayo de ELISA, destacándose una sensibilidad del 100% en las técnicas de IDD, CIE y ELISA (Tabla II).

Análisis estadístico

Con el fin de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas, entre los resultados obtenidos por una técnica u otra, se aplicó la prueba de Chi-cuadrado, que no arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas serológicas utilizadas (Tabla III). En relación al análisis de la curva de rendimiento diagnóstico o curva ROC, se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de $0,99 \pm 0,014$, lo que representa un buen valor diagnóstico (Fig. 4).

TABLA I
ELISA EN LA DETECCIÓN DE IgG CONTRA EL ANTÍGENO CRUDO DE *S. schenckii sensu stricto*

Grupo de pacientes (nº de pacientes)	Nº de pacientes positivos	Promedio de Absorbancia \pm EE
Esporotricosis (25)	25	1,523 \pm 0,416
Histoplasmosis (49)	0	0,240 \pm 0,135
Paracoccidioidomicosis (50)	1	0,421 \pm 0,122
Leishmaniasis (30)	0	0,274 \pm 0,098
Tuberculosis(30)	0	0,284 \pm 0,142
Lupus(24)	5	0,574 \pm 0,215
Individuos sanos(50)	1	0,318 \pm 0,164

TABLA II
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD EN LAS DIFERENTES TÉCNICAS SEROLÓGICAS MEDIANTE EL EMPLEO DEL ANTÍGENO CRUDO DE *S. schenckii sensu stricto*

Técnica	Sensibilidad	Especificidad
IDD	100%	100%
CIE	100%	100%
ELISA	100%	98%

IDD: Inmunodifusión doble; CIE: Contrainmunolectroforesis.

TABLA III
COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS IDD, CIE Y ELISA, AL UTILIZAR EL ANTÍGENO CRUDO DE *S. schenckii sensu stricto*

Sensibilidad	p*	Especificidad	p*
IDD vs. CIE	0,992	IDD vs. CIE	0,999
IDD vs ELISA	0,998	IDD vs ELISA	0,999
CIE vs ELISA	0,995	CIE vs ELISA	0,999

* χ^2 .

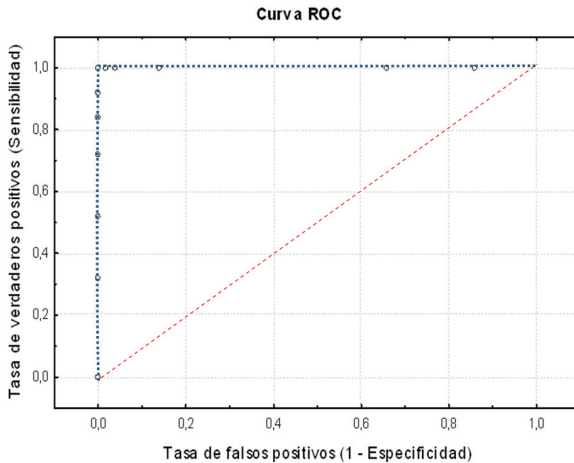


Fig. 4. Curva ROC descrita por la prueba de ELISA. El área bajo la curva (AUC) es $0,99 \pm 0,014$.

DISCUSIÓN

Para la detección de anticuerpos en sueros de pacientes con micosis, se han utilizado los ensayos serológicos a lo largo de los años (15, 21, 24, 32). En el caso de la esporotricosis, se presentan diversas formas clínicas, las cuales podrían ser influenciadas por ciertos factores, como la carga de inóculo, el estado inmune del huésped, la virulencia de la cepa inoculada y la profundidad de la inoculación traumática. Hasta ahora, no existe evidencia científica que pueda explicar la aparición de las formas cutáneas diseminadas y extra-cutáneas en pacientes inmunocompetentes (33).

Con relación al diagnóstico serológico, se hace difícil realizarlo en los casos clínicos con las formas cutáneas fijas, debido a que la presencia de anticuerpos circulantes varía de acuerdo a la extensión de las lesiones; detectándose solo en un 15% en la forma clínica cutánea localizada, mientras que se obtiene un 100% de positividad en los pacientes con lesiones más extensas (34). Esto podría ser consecuencia, de que una vez inoculado el hongo por vía traumática, se activa la respuesta inmune innata, con

activación de macrófagos y otros intermediarios de la respuesta inmune, los cuales activan posteriormente la respuesta tipo Th1, con activación de las células CD_4^+ y LTC, generando una respuesta del tipo celular y ocasionando que los pacientes con lesiones cutánea fija, sean positivos a las pruebas intradérmicas, pero con una respuesta baja al estudio humoral. Mientras que, a mayor tiempo de evolución de la lesión, se permite el desarrollo de la respuesta tipo Th2, involucrada con la respuesta humoral presente en las lesiones crónicas (35).

En el presente trabajo, se utilizó el antígeno crudo de *S. schenckii sensu stricto*, obtenido a partir de la forma micelial del hongo, el cual ha sido previamente caracterizado, presentando un componente de 55kDa, con un óptimo de producción en la fase estacionaria de crecimiento. Este antígeno está influenciado por la composición del medio de cultivo, pH y la fase de crecimiento del hongo (23). Además, este antígeno de *S. schenckii sensu stricto* no reacciona de forma cruzada con muestras de sueros de coccidioidomicosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis por la técnica de inmunodifusión e inmunoelectroforesis (23). Sin embargo, este antígeno no había sido ensayado por la técnica de ELISA en Venezuela, la cual se estandarizó y se probó con un mayor número de sueros positivos para esporotricosis y sueros de otras patologías para evaluar la reactividad cruzada, además de comparar los resultados con otros ensayos serológicos.

En cuanto a la epidemiología en Venezuela, se conoce que en la mayoría de los casos de esporotricosis diagnosticados, se trata de pacientes con una edad promedio de 30 años aproximadamente, seguidos muy de cerca por individuos menores de 15 años. Con referencia al género, se ha observado un 71,4% en hombres y en un 28,6% en mujeres, con la forma clínica predomi-

nante de la esporotricosis linfangítica, en el 63,15% de los casos. Los pacientes más comúnmente afectados son los estudiantes (37,6%), por debajo de 15 años de edad, seguidos por los agricultores (29,3%) y las amas de casa (6,8%) (36).

En relación a los ensayos inmunoenzimáticos, es importante señalar que estos se han utilizado con mayor frecuencia para fines de serodiagnóstico desde hace algunos años. En 1989 Scott y Muchmore (37), elaboraron un antígeno en fase de levadura, que mostraba moléculas de 40 a 70 kDa por SDS-PAGE, con una sensibilidad de 100% y 95% de especificidad. Sin embargo, al reproducir esos datos, otros investigadores encontraron una alta reactividad cruzada (38). Por otro lado, antígenos de pared celular obtenidos a partir de la fase de levadura del hongo, utilizando métodos de purificación con concanavalina A, mostraron 100% de sensibilidad con 35 sueros positivos para esporotricosis; pero tuvieron reactividad cruzada con sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea (39). Igualmente, Bernardes-Engemann y col. (40), elaboraron antígenos de pared celular, los cuales fueron probados con 92 pacientes de esporotricosis, y obtuvieron 90% de sensibilidad y 80% de especificidad. Mientras que, Almeida-Paes y col. (21), siguiendo la metodología descrita por Mendoza y col. (23), sobre la producción del antígeno a partir de la forma de micelio del hongo y aplicando al serodiagnóstico de las diversas formas clínicas de la esporotricosis por el método de ELISA, encontraron una especificidad del 89% y una sensibilidad ubicada entre 90-97%. No obstante, cabe destacar que, estos estudios demostraron reacciones cruzadas con paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, y aspergilosis. Sin embargo, es importante resaltar que, algunos investigadores han concluido que el usar el antígeno y la técnica de ELISA, pudiera convertirse en una herramienta útil para el diagnóstico

complementario de dicha micosis (20, 21, 39).

En el presente trabajo, al utilizar la técnica de ELISA y el antígeno de *S. schenckii sensu stricto*, se estableció un punto de corte de 0,736 y una sensibilidad y especificidad por encima del 98%. En relación a los falsos positivos, se obtuvo 6 sueros positivos, 1 suero de paciente con paracoccidioidomicosis y 5 sueros de pacientes con lupus, la cual es una enfermedad con caracteres clínicos y epidemiológicos muy distintos a la esporotricosis. Por otra parte, es necesario mencionar que, recientemente se realizaron estudios de biología molecular para la tipificación de los 25 aislados obtenidos de los pacientes con esporotricosis evaluados, de los cuales 22 resultaron *S. schenckii sensu stricto* y 3 aislados fueron *S. globosa* (27), donde se resalta que los sueros de los pacientes de estos tres últimos resultaron positivos para el serodiagnóstico (IDD, CIE y ELISA). Esto, puede ser consecuencia de que se ha reportado que en los perfiles antigénicos de los aislados del complejo, se han observado similitudes antigénicas entre *S. brasiliensis*, *S. schenckii* y *S. globosa* (25), por lo que resulta necesario para futuros trabajos, probar el antígeno con un mayor número de sueros de pacientes con cultivos positivos para *S. globosa*, u otras especies del complejo, para determinar si el antígeno micelial sólo aplica para sueros de pacientes de *S. schenckii sensu stricto* o para otras especies del complejo.

En cuanto al análisis estadístico, al comparar las técnicas entre sí, utilizando el Test de Chi-cuadrado, se observó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las mismas, debido a que se obtuvo una especificidad por encima del 98% con todas las técnicas. En cuanto a la sensibilidad, los valores de P indican que no existe diferencia significativa entre las técnicas, lo cual en términos estadísticos significa, que las pruebas son equivalentes en cuanto

a su capacidad de diagnóstico y a su aplicación. Por otra parte, los resultados de ELISA obtenidos, generaron un área bajo la curva de $0,99 \pm 0,014$, pudiéndose observar que la curva se encuentra en la parte superior izquierda del espacio ROC. En general, los valores superiores a 0,9 indican una alta precisión de la prueba, lo que significa que las decisiones tomadas en base a ella son confiables. Finalmente, se concluye, que este ensayo constituye un método específico y sensible para el diagnóstico de la esporotricosis y podría ser útil para monitorizar la evolución de la enfermedad y respuesta al tratamiento.

REFERENCIAS

1. Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos, Lazéra M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol 2006; 44:3251-3256.
2. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol 2007; 45:3198-206.
3. Morris-Jones, R. Sporotrichosis. Clin Exp Dermatol 2002; 27(6): 427-431.
4. Mackinnon JE, Conti-Diaz IA, Gezuele E, Civila E, Da Luz S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. Sabouradia 1969; 7(1): 38-45.
5. Mendoza M, Díaz E, Alvarado P, Romero E, Albornoz M. Aislamiento de *Sporothrix schenckii* del medio ambiente en Venezuela. Rev Iberoam Micol 2007; 24(4): 317-319.
6. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, Schubach TM, Pereira SA, Fernandes GF, Bezerra LM, Felipe MS, de Camargo ZP. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. PLoS Negl Trop Dis 2013; 20: 7(6):e2281. doi: 10.1371/journal.pntd.0002281.
7. Oliveira MM, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. Mycopathologia. 2011; 172(4):257-267.
8. Rodrigues AM, de Hoog S, de Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. Med Mycol 2013; 51(4): 405-412.
9. Bastos M, de Almeida-Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. Clin Microbiol Rev 2011; 24(4): 633-654.
10. Martínez Méndez D, Hernández Valles R, Alvarado P, Mendoza M. Mycoses in Venezuela: Working Groups in Mycology reported cases (1984-2010). Rev Iberoam Micol 2013; 30(1):39-46.
11. Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SH. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. Med Mycol 2003; 41(6): 539-542.
12. Díez S, Gómez BL, McEwen JG, Restrepo A, Hay RJ, Hamilton AJ. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1536-1542.
13. Albuquerque CF, da Silva SH, Camargo ZP. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1944-1946.
14. Guimarães AJ, Pizzini CV, De Matos Guedes HL, Albuquerque PC, Peralta JM, Hamilton AJ, Zancopé-Oliveira RM. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. J Med Microbiol 2004; 53: 509-514.
15. Guimarães AJ, Pizzini CV, De Abreu Almeida M, Peralta JM, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using purified, deglycosylated histoplasmin for different clinical manifestations of histoplasmosis. Microbiol Res 2010; 17; 2(1) doi: 10.4081/mr.2009.e1.
16. Oberto-Perdigón L, Romero H, Pérez-Blanco M, Apitz-Castro R. An ELISA test

- for the study of the therapeutic evolution of chromoblastomycosis by *Cladophialophora carrionii* in the endemic area of Falcon State, Venezuela. Rev Iberoam Micol 2005; 22(1):39-43.
17. **Vidal MS, De Castro LG, Cavalecate SC, Lacaz Cda S.** Immunoprecipitation techniques and ELISA in the detection of anti-*Fonsecaea pedrosoi* antibodies in chromoblastomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2003; 45(6): 315-318.
 18. **Kondori N, Edebo L, Mattsby-Baltzer I.** *Candida albicans* cell wall antigens for serological diagnosis of candidemia. Med Mycol 2003; 41(1): 21-30.
 19. **Kostiala AA and Kostiala I.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgM, IgG and IgA class antibodies against *Candida albicans* antigens: development and comparison with other methods. Sabouraudia 1981; 19(2):123-134.
 20. **Bernardes-Engemam AR, Costa RC, Miguens BR, Penha CV, Neves E, Pereira BA, Dias CM, Mattos M, Gutierrez MC, Schubach A, Oliveira Neto MP, Lazéra M, Lopes-Bezerra LM.** Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. Med Mycol 2005; 43(6): 487-493.
 21. **Almeida-Paes R, Pimenta MA, Pizzini CV, Monteiro PC, Peralta JM, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM.** Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. Clin Vaccine Immunol. 2007; 14(3):244-249.
 22. **Lima OC, Bezerra LM.** Identification of a concanavalin A-binding antigen of the cell surface of *Sporothrix schenckii*. J Med Vet Mycol 1997; 35(3):167-172.
 23. **Mendoza M, Díaz AM, Hung MB, Zambrano EA, Díaz E, De Albornoz MC.** Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. Med Mycol 2002; 40(5): 447-454.
 24. **Almeida-Paes R, Bailão AM, Pizzini CV, Reis RS, Soares CM, Peralta JM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM.** Cell-free antigens of *Sporothrix brasiliensis*: antigenic diversity and application in an immunoblot assay. Mycoses 2012; 55(6): 467-475.
 25. **Fernandes GF, dos Santos PO, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E, de Camargo ZP.** Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. Virulence 2013; 4(3): 241-249.
 26. **Ruiz-Baca E, Hernández-Mendoza G, Cuéllar-Cruz M, Toriello C, López-Romero E, Gutiérrez-Sánchez G.** Detection of 2 immunoreactive antigens in the cell wall of *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix globosa*. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 79(3):328-330.
 27. **León-N I.** Caracterización de aislamientos del complejo *Sporothrix* spp. provenientes de diferentes regiones de Venezuela [Tesis de maestría]. Caracas: IVIC; 2013.
 28. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193(1): 265-275.
 29. **Palmer D, Kaufman L, Kaplan W, Cavallaro J.** Serodiagnosis of Mycotic Diseases. Preparation of Rabbit Anti- *C. neoformans* globulin and normal globulin solution. American Lecture Series 1981; 103-105.
 30. **Ouchterlony O.** Antigen-antibody reactions in gels. Acta Pathol Microbiol Scand 1949; 26(4):507-515.
 31. **Domínguez A, González R.** Análisis de las curvas receiver-operating characteristic: un método útil para evaluar procedimientos diagnósticos. Rev. Cubana Endocrinol 2002; 13 (2): 169-176.
 32. **De Albornoz M.B, Villanueva E and de Torres E.** Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. Mycopathologia 1984; 85(3): 177-183.
 33. **Lopes-Bezerra LM.** *Sporothrix schenckii* cell wall peptide rhamnomannans. Front Microbiol 2011; 2: 243. doi: 10.3389/fmicb.2011.00243.

34. **Bonifaz A.** Esporotricosis. *Micología Médica Básica*. 3ª Ed. México. Editorial Internacional Me Graw Hill. 2010, p 179-196.
35. **Abbas A, Lichtman A.** *Inmunología celular y molecular*. 5ª Ed. Madrid, España. Elsevier Science. 2004, p 345-366.
36. **Mata-Essayag S, Delgado A, Colella MT, Landaeta-Nezer ME, Rosello A, Perez de Salazar C, Olaizola C, Hartung C, Magaldi S, Velasquez E.** Epidemiology of sporotrichosis in Venezuela. *Int J Dermatol* 2013; 52(8):974-980.
37. **Scott EN, Muchmore HG.** Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 1989; 27(2): 300-304.
38. **Bastos M, de Almeida-Paes R, Schubach AO.** *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(4): 633-654.
39. **Penha CV, Bezerra LM.** Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*: a serological study. *Med Mycol* 2000; 38(1):1-7.
40. **Fernandes GF, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR, Schubach TM, Dias MA, Pereira SA, de Camargo ZP.** Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. *Vet Microbiol* 2011; 147(3-4):445-449.