

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA



TESIS DE GRADO

“ELABORACIÓN DE ESPOROTRICINA: ANTÍGENO DE
Sporothrix schenckii PARA REACCIÓN INTRADÉRMICA
COMO DIAGNÓSTICO DE ESPOROTRICOISIS Y
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LEISHMANIASIS
ESPOROTRICOIDE.”

ELABORADO POR: Nazaret Molero Romero

TUTOR: Dra. Wilma Strauss Zegada.

(TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA)

LA PAZ – BOLIVIA

2016

Dedicatoria

A mi familia, a mi esposo e hijos
que han sido mi motor y empuje durante
la elaboración de este trabajo.

Agradecimientos

A Dios por darme la vida, por no levantar nunca su mano de mi cabeza y por permitir la elaboración y conclusión de este trabajo

A mi familia, a mi esposo e hijos por el apoyo, la comprensión y la paciencia durante la culminación de mi carrera y de este trabajo.

A mis padres por todo lo que me han dado durante toda mi vida, por mi formación, por su apoyo, su ayuda y por estar siempre a mi lado.

A mi tutora, Dra. Wilma Strauss, por todo su apoyo, conocimiento y sabiduría tanto profesional como existencial, por su paciencia, colaboración y comprensión, por su amistad y todo su cariño maternal.

A todas las personas que hicieron posible la elaboración de este trabajo, al Instituto SELADIS, a la Unidad de Dermatología y Laboratorio de Micología del Hospital General, y en general a todas las personas que contribuyeron de muchas maneras a la elaboración y conclusión del trabajo.

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN.....	16
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3.	JUSTIFICACIÓN.....	19
4.	OBJETIVOS	20
4.1	Objetivo general.....	20
4.2	Objetivos específicos.....	20
5.	ANTECEDENTES.....	21
6.	MARCO TEÓRICO	22
6.1	Esporotricosis:.....	22
6.1.1	Historia	22
6.1.2	Definición.....	23
6.1.3	Epidemiología	23
6.1.3.1	Población en riesgo	23
6.1.3.2	Prevalencia	24
6.1.4	Agente etiológico	25
6.1.4.1	Características generales de <i>Sporothrix schenckii</i>	26
6.1.4.2	Factores de virulencia.....	27
6.1.4.3	Fisiopatogenia.....	29
6.1.4.4	Proteínas de la pared celular de <i>Sporothrix schenckii</i> como moléculas Inmunoprotectoras.....	32
6.1.5	Clasificación esporotricosis	33
6.1.6	Diagnóstico	38
6.1.6.1	Cultivo micológico.....	38
6.1.6.2	Estudio Histopatológico	40
6.1.6.3	Amplificación del ADN mediante PCR (Reacción en cadena de polimerasa)	41
6.1.6.4	Pruebas serológicas	41
6.1.6.5	Intradermorreacción con Esporotricina:	42
6.1.7	Tratamiento.....	42
6.1.7.1	El Yoduro de Potasio.....	42
6.1.7.2	Azoles.....	42
6.1.7.3	Alilaminas.....	43
6.1.7.4	Polienos. Anfotericina B.....	43
6.1.7.5	Termoterapia local	43

6.1.8	Esporotricina	43
6.1.8.1	Generalidades	43
6.1.8.2	Antígenos celulares de <i>Sporothrix schenckii</i>	44
6.1.8.3	Producción de la esporotricina	45
6.1.8.4	Cómo funciona	45
6.1.8.5	¿Qué es intradermoreacción?	45
6.1.8.6	Criterios de diagnóstico	47
6.1.8.7	Aplicaciones	48
6.1.8.8	Ventajas	48
6.1.8.9	Desventajas	48
6.2	Leishmaniasis	48
6.2.1	Descripción	48
6.2.2	Epidemiología	49
6.2.2.1	Distribución geográfica	49
6.2.2.2	Principales factores de riesgo.....	49
6.2.3	Etiología	50
6.2.3.1	Ciclo vital del parásito <i>Leishmania</i>	50
6.2.4	Cuadro clínico	51
6.2.5	Diagnóstico	52
6.2.6	Tratamiento	52
7.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	52
7.1	Obtención de cepas de referencia.....	54
7.2	Identificación de pureza del cultivo.....	56
7.3	Mantenimiento y cultivo masivo de la cepa de <i>S. schenckii</i>	58
7.4	Cosecha de las colonias de <i>S. schenckii</i> cultivadas.....	59
7.5	Preparación de la pasta antigénica	61
7.6	Proceso de sonicado.....	64
7.7	Proceso de centrifugado	64
7.8	Esterilización del antígeno obtenido.....	65
7.9	Ajuste de densidad del antígeno	66
7.10	Verificación de no infectividad del antígeno	68
7.11	Verificación de la inocuidad del antígeno	69
8.	RESULTADOS.....	71

8.1	Identificación de la pureza del cultivo	71
8.2	Proceso de sonicado y centrifugado.	75
8.3	Esterilización del antígeno obtenido.	75
8.4	Ajuste de densidad del antígeno.	76
8.5	Verificación de la no infectividad del antígeno.	78
8.6	Verificación de la inocuidad del antígeno esporotricina.	79
9.	DISCUSIÓN	81
10.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
10.1	Conclusiones.....	84
10.2	Recomendaciones.....	85
11.	BIBLIOGRAFÍA.	87
	ANEXOS	89

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	90
ANEXO 2	91
ANEXO 3	94
ANEXO 4	96
ANEXO 5	97

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Pared celular fúngica.....	17
Figura 2. Morfología microscópica de <i>Sporothrix schenckii</i> . Se observan hifas finas, ramificadas, septadas y con conidióforos de los que nacen conidios dispuestos en forma de pétalos de margarita.	26
Figura 3. Colonias de cultivo de <i>Sporothrix schenckii</i> . Se observan colonias de aspecto membranoso con pliegues radiales de color blanco.....	27
Figura 4. Mecanismo de infección de <i>Sporothrix schenckii</i> . Se observa el pinchazo con una espina de rosal, la aparición de una pequeña pápula en el lugar de la lesión, y el avance de la infección por vía linfática.	32
Figura 5. Fotografía de paciente con esporotricosis cutáneo linfática. Se observa la diseminación de la infección con la aparición de pápulas, algunas ulceradas que siguen el trayecto linfático.....	34
Figura 6. Fotografía de extremidad superior de paciente con esporotricosis cutánea fija. Se observa la placa verrucosa, en un solo lugar, rodeada del halo eritematovioláceo.....	35
Figura 7. Fotografía de paciente con esporotricosis cutáneo superficial en la cara. Se observan las placas eritemato-escamosas violáceas.....	35
Figura 8. Esporotricosis cutáneo diseminada o hematógena. Se observa varias regiones del cuerpo en las que se presentan abscesos o úlceras.....	36
Figura 9. Esporotricosis osteoarticular dolorosa de muñeca y dedos de la mano en paciente VIH positivo.....	37
Figura 10. Esporotricosis pulmonar observada en un carpintero. Se observan dos lesiones cavitadas con pared delgada.	37
Figura 11. Colonia de <i>Sporothrix schenckii</i> , crecida en ADS, a 7 días y temperatura ambiente. Fuente: (Hernandez, 2015)	39
Figura 12. Examen microscópico de <i>Sporothrix schenckii</i> . Hifas finas, conidióforos largos y conidios simpodiales organizados en forma de flor de margarita (40X). Fuente: (Hernandez, 2015)	40
Figura 13. Esporotricosis localizada. Biopsia de piel. Hiperplasia pseudoepiteliomatosa epidérmica	41
Figura 14. Esporotricosis linfangítica. Se observa granuloma con abundantes neutrófilos, células epitelioides y linfocitos. Se observa la presencia del cuerpo asteroide eosinofílico característico.....	41
Figura 15. Antígeno presentado a LT y transformación a células de memoria. Fuente: (Rodríguez, 2008)	46
Figura 16. Fenómeno ocurrido en una prueba de intradermorreacción. Segundo ingreso del antígeno y producción de la induración.	47
Figura 17. Ciclo vital de <i>Leishmania</i>	51
Figura 18.A. Cepa de referencia obtenida del Hospital General. La Paz.	54
Figura 19. Colonias de <i>S. schenckii</i> sembradas en agar Sabouraud dextrosa. Fuente: Elaboración propia	55

Figura 20. Estufa de cultivo microbiológico donde se incuba el cultivo de <i>S. schenckii</i> . Fuente: Elaboración propia	55
Figura 21. Cultivo obtenido a partir de la cepa de referencia, donde se observan las características morfológicas macroscópicas.	56
Figura 22. Material utilizado para la identificación de la pureza del cultivo.	57
Figura 23. Observación microscópica de <i>S. schenckii</i> donde se confirma la pureza del cultivo. Fuente: Elaboración propia	57
Figura 24. Sembrado de <i>S. schenckii</i> para cultivo masivo.	58
Figura 25. Cultivo masivo de <i>S. schenckii</i> . Fuente: Elaboración propia	59
Figura 26.A. Material utilizado para la cosecha de colonias de <i>S. schenckii</i> . B. Esterilización del material durante el proceso de cosecha. C. D. Cosecha de colonias de <i>S. schenckii</i> E. Colonias cosechadas. Fuente: Elaboración propia.	61
Figura 27. Material utilizado para la preparación de la solución PBS.	61
Figura 28.A. Triturado de colonias en mortero estéril. B.C. Triturado de colonias con PBS en triturador de tejidos. D. Pasta antigénica.	63
Figura 29. Pasta antigénica preparada. Fuente: Elaboración propia.	63
Figura 30. Pasta antigénica en proceso de sonicado.	64
Figura 31. Pasta antigénica en proceso de centrifugado.	65
Figura 32. Escala de Mc. Farland. Fuente: Elaboración propia	66
Figura 33. Espectrofotómetro donde se realiza la lectura de absorvancia del antígeno y tubo nº 5 de la escala para el ajuste de densidad.	67
Figura 34. Medios de cultivo y campana de flujo continuo, estériles para la siembra del antígeno. Fuente: Elaboración propia	68
Figura 35. Medios de cultivo: agar Sangre y agar Nutritivo, antes de la siembra del antígeno elaborado. Fuente: Elaboración propia.....	68
Figura 36. Inoculación del antígeno Esporotricina en los animales de experimentación. Fuente: Elaboración propia	70
Figura 37. Animales de experimentación inoculados con Esporotricina en observación. Fuente: Elaboración propia	70
Figura 38. Observación macroscópica de <i>S. schenckii</i> . Colonias características membranosas, bordes radiales y blancas.	71
Figura 39. Observación microscópica de <i>S. schenckii</i> . Hifas finas, ramificadas con conidióforos en forma de margarita. Fuente: Elaboración propia.	72
Figura 40. Observación macroscópica del cambio de fase. A. Fase micelial. B. Fase levaduriforme. Fuente: Elaboración propia	73
Figura 41. Observación microscópica del cambio de fase. A. Fase micelial. B. Fase levaduriforme. Fuente: Elaboración propia.	74
Figura 42. Comparación de densidad del antígeno preparado con el tubo nº 5 de la escala de Mc. Farland. Fuente: Elaboración propia.	76
Figura 43. Curva de determinación de proteínas. Se observa la curva obtenida con las absorbancias de la Escala de Mc Farland y el punto de extrapolación de la absorbancia obtenida del antígeno Esporotricina. Fuente: Elaboración propia.....	78

Figura 44. Medios de cultivo: agar Sangre, agar Nutritivo y agar Sabouraud incubados, donde no se observó crecimiento. Fuente: Elaboración propia	79
Figura 45. Observación de animales de experiemntación inoculados con Esporotricina. A. Observación del comportamiento y estrés de los animales. Primeros días. B. Observación de alteraciones, lesiones y fiebre en los animales. Primeros días. Fuente: Elaboración propia.	80
Figura 46.Observación de animales de experiemntación inoculados con Esporotricina. A. Observación del comportamiento y estrés de los animales. Último día. B. Observación de alteraciones, lesiones y fiebre en los animales. Último día.Fuente: Elaboración propia	81
Figura 47. A. Agar Sabouraud deshidratado. B. Preparación de agar Sabouraud. Fuente: Elaboración propia	91
Figura 48. A. Solución trabajo PBS 10x. B. Material utilizado para la elaboración de PBA 1x. Fuente: Elaboración propia	95

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Taxonomía de <i>Sporothrix schenckii</i>	25
Tabla 2. Tabla de absorbancias obtenidas de la escala de Mc Farland.Fuente: Elaboración propia.	77
Tabla 3. Tabla de comportamiento de los ratones inoculados con el antígeno. Fuente: Elaboración propia	80
Tabla 4. Tabla de materiales y recursos utilizados. Fuente: Elaboración propia....	90
Tabla 5. Composición de Agar Sabouraud dextrosa.Fuente:Master Group ltd	91
Tabla 6. Composición de Agar BHI. Fuente:Master Group ltd	92
Tabla 7. Composición de Agar Sangre. Fuente: Master Group ltd	92
Tabla 8. Composición de Agar nutritivo. Fuente:Master Group ltd	93
Tabla 9. Composición de Solución trabajo PBS (10x). Fuente:(Humana, 2008)	94
Tabla 10.Preparación de la Escala de Mc Farland. Fuente: (Gamazo, 2005).....	96

“Elaboración de Esporotricina: Antígeno de *Sporothrix schenckii* para reacción intradérmica como diagnóstico de Esporotricosis y diagnóstico diferencial de Leishmaniasis Esporotricoides.”

RESUMEN

Introducción: La esporotricosis es una infección subaguda o crónica que afecta al hombre y otros mamíferos, es causada por el hongo *Sporothrix schenckii* que se encuentra en la vegetación afectando a trabajadores que están en contacto frecuente con esta. La infección ingresa por una lesión con la planta infectada, donde se desarrolla una pápula que llega a convertirse en una úlcera, el hongo sigue los vasos linfáticos del cuerpo apareciendo nuevas pápulas en filas sobre la piel a medida que la infección avanza. La enfermedad es tratable y se cura con el tratamiento adecuado, sin embargo, existen formas de esporotricosis como la esporotricosis sistémica, que comprometen la vida del paciente infectado, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. La frecuencia de esporotricosis en nuestro medio no es muy alta; sin embargo, la elaboración del antígeno Esporotricina reviste mucha importancia en el diagnóstico diferencial con los casos de Leishmaniasis esporotricoides debido a que las lesiones presentan mucha similitud y la intradermorreacción con Esporotricina solo da positivo en casos de Esporotricosis y no así en casos de Leishmaniasis ni ninguna otra micosis cutánea. La Esporotricina es una fracción química del complejo molecular péptido-polisacárido específico de la pared celular del hongo *Sporothrix schenckii* que se utiliza como antígeno para realizar la prueba de intradermorreacción con Esporotricina (IRE). Actualmente, el diagnóstico de esporotricosis se realiza por medio de cultivo, cuyos resultados se obtienen en un período de 8 a 15 días, por lo tanto, es importante contar con un método de diagnóstico como es la intradermorreacción que pueda arrojar resultados para diagnóstico en forma rápida y específica. Por otra parte, entre los diferentes tipos de manifestaciones clínicas de Leishmaniasis existe la Leishmaniasis esporotricoides, esta presenta lesiones muy similares a la esporotricosis y no existen pruebas de diagnóstico diferencial para estas dos patologías, motivo por el cual sería importante contar con una prueba de diagnóstico rápido y específico que pueda hacer un diagnóstico

diferencial entre ambas, lo cual beneficiaría tanto a médicos dermatólogos como a pacientes. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es la elaboración del antígeno Esporotricina, para el diagnóstico rápido y específico de infecciones causadas por *Sporothrix schenckii*, así como su uso en el diagnóstico diferencial de Leishmaniasis.

Metodología: Para la elaboración del antígeno Esporotricina se obtuvo una cepa de referencia de *Sporothrix schenckii* y se realizó un cultivo de esta, se realizaron pruebas para identificar la pureza del cultivo y una vez confirmada la pureza se realizó el cultivo masivo del hongo. Una vez obtenida la cantidad de cultivos necesaria para la elaboración del antígeno, se cosecharon las colonias de *S. schenckii* cultivadas y a partir de las colonias se elaboró el antígeno como tal; para esto se trituraron las colonias, se preparó una pasta antigénica, la pasta elaborada fue sometida a proceso de sonicación y posteriormente a centrifugación; una vez obtenida la solución antigénica se esterilizó por método de tindalización y se realizó el ajuste de densidad por turbidimetría utilizando la Escala de Mc Farland y realizando lectura de absorbancias para obtener la concentración aproximada del antígeno Esporotricina por extrapolación en la curva patrón de la Escala de McFarland. Se verificó la esterilidad del antígeno Esporotricina elaborado mediante cultivos del mismo en medios enriquecidos, y se verificó la inocuidad del antígeno Esporotricina por inoculación de este en animales de experimentación.

Resultados y conclusiones: A partir del cultivo puro obtenido de *S. schenckii* se elaboró el antígeno; con la curva patrón realizada a partir de las absorbancias de la Escala de Mc Farland y se hizo extrapolación del punto de absorbancia del antígeno Esporotricina, determinando una concentración aproximada del antígeno; se realizaron las pruebas de no infectividad e inocuidad del producto, en las cuales se observó una total esterilidad del antígeno elaborado y se comprobó su inocuidad. Se concluye que el antígeno Esporotricina es totalmente seguro para su uso en el diagnóstico de Esporotricosis y diagnóstico diferencial de Leishmaniasis esporotricóide.

Palabras clave: Antígeno Esporotricina, Esporotricosis, Leishmaniasis, Intradermoreacción.

ABSTRACT

Introduction: Sporotrichosis is a sub-acute or chronic infection that affects man and other mammals. Its causal agent is the fungus *Sporothrix schenckii*, that is in nature plants and soil. It affects humans that work close to them. It enters through a wound caused by the infected plant. There a papule develops and it becomes an ulcer. The fungus advances through the lymphatic vessels showing new papules and ulcers on the skin as the infection develops. The disease is treatable, and it can be healed with proper treatment. However, there are forms of sporotrichosis as the disseminated sporotrichosis, which damages the life of the infected patient, especially of those who are immunocompromised.

Sporotrichosis frequency in our environment is not too high. However Sporotricine antigen manufacturing is very important in the differential diagnosis in the sporotrichoid leishmaniasis cases, because lesions of both diseases look alike. The intradermoreaction with sporotricine only reports positive in sporotrichosis cases. Neither Leishmaniasis nor other cutaneous mycosis is reported positive by this test.

Sporotricine is a chemical fraction of the peptide polysaccharide molecular complex of the cellular wall of the fungus *Sporothrix schenckii*. It is used as an antigen to make the intradermoreaction with Sporotricine test (IRE).

Nowadays sporotrichosis diagnosis is done by the culture in a growth medium; its results are obtained in an eight to fifteen day period. That is why it is important to count on a diagnosis method such as intradermoreaction that can give results for fast and specific diagnosis.

Besides, in different types of clinic manifestations of Leishmaniasis exists the sporotrichoid leishmaniasis. It shows lesions that are very similar to sporotrichosis. There are not differential diagnosis tests for this two pathologies. It would be important to have a fast and specific diagnosis test that could make a differential diagnosis test between both. It would benefit not only dermatologists but also patients.

Therefore, the objective of this project is to manufacture Sporotricine antigen for fast and specific diagnosis of infections caused by *Sporothrix schenckii* and its use in the differential diagnosis of Leishmaniasis.

Method: To manufacture the Sporotricine antigen, a strain of *Sporothrix schenckii* was obtained in order to make a culture of it. Proofs were made to identify the purity of the culture. Once it was confirmed a massive culture of the fungus was made. After the necessary quantity of culture for the antigen manufactory was obtained, the colonies were crushed and an antigen ground was prepared with them. This product was exposed to a sonication process and it was centrifugated later. Once the antigenic solution was obtained, it was sterilized by the tyndallization method and the density adjust was done by turbidimetry using McFarland scale and making an absorbance reading to know the approximate concentration of sporotricine antigen with extrapolation in the McFarland scale's curve pattern. The sterility of the manufactured Sporotricine antigen was verified by cultures in enriched media. The safety was verified by inoculating laboratory animals.

Results and conclusions: From pure culture obtained from *S. schenckii* antigen was manufactured; with the pattern curve made using the absorbances of McFarland scale and extrapolation Sporotricine antigen's absorbance point an approximated concentration of antigen was determined;

Proofs of no infectiousness and safety of the product showed a total sterility of the manufactured antigen. The safety of the antigen was proved by the behavior and total health status of the inoculated animals.

It is concluded that Sporotricine antigen is totally safe to use in Sporotrichosis diagnosis and differential diagnosis of sporotrichoid leishmaniasis.

Keywords: Antigen sporotrichin , Sporotrichosis , Leishmaniasis , intradermoreaction.

1. INTRODUCCIÓN

La esporotricosis es una infección subaguda o crónica que afecta al hombre y otros mamíferos, es causada por el hongo *Sporothrix schenckii* que se encuentra en la vegetación. La infección ocurre comúnmente cuando la piel se lesiona al manipular materiales vegetales como rosales, zarzas o tierra abonada y también con la manipulación de troncos de árboles.

Es considerada la micosis subcutánea más común en Latinoamérica.

La esporotricosis puede ser una enfermedad ocupacional de granjeros, leñadores, horticultores, cultivadores de rosas y trabajadores de viveros. La esporotricosis generalizada (diseminada) se puede desarrollar en personas con sistemas inmunitarios comprometidos cuando inhalan polvo lleno de esporas.

Los síntomas comprenden una pápula pequeña, rojiza e indolora que se desarrolla en el sitio de la infección y que se convierte finalmente en una úlcera. La pápula puede desarrollarse hasta 3 meses después de la lesión (Ayats Ardite J. , 2005).

La infección inicial se presenta a menudo en las manos y antebrazos porque estas áreas son las más expuestas al trauma; le siguen en importancia las piernas.

El hongo sigue los vasos linfáticos en el cuerpo, apareciendo pequeñas pápulas en filas sobre la piel a medida que la infección sube por un brazo o una pierna. Estas lesiones no sanan, a menos que reciban tratamiento, y pueden permanecer por años.

La presentación clínica más frecuente es la forma cutáneo linfangítica, le sigue en importancia la forma cutáneo fija y finalmente la forma cutáneo seca cuya apariencia es similar a la lesión de Leishmaniasis cutáneo escamosa o esporotricóide. Las lesiones más frecuentes son nódulos, úlceras y trayectos linfangíticos.

La esporotricosis generalizada (sistémica) puede causar problemas respiratorios y pulmonares, infección del hueso, artritis e infección del sistema nervioso (Rubio, 2010).

La frecuencia de Esporotricosis en Bolivia no es muy alta, existe una frecuencia de 15 casos al año según los datos obtenidos en el Hospital General de la ciudad de

La Paz en los años 2013-2015; sin embargo la elaboración del antígeno de Esporotricina reviste mucha importancia en el diagnóstico diferencial con los casos de Leishmaniasis, especialmente en casos de Leishmaniasis esporotricoides debido a que las lesiones presentan mucha similitud y la intradermorreacción con Esporotricina solo da positivo en casos de Esporotricosis y no así en casos de Leishmaniasis ni ninguna otra micosis cutánea.

La Esporotricina es una fracción química del complejo molecular péptido-polisacárido específico de la pared celular del hongo *Sporothrix schenckii* que se utiliza como antígeno para realizar la prueba de intradermorreacción con Esporotricina (IRE)

Pared Celular Hongos

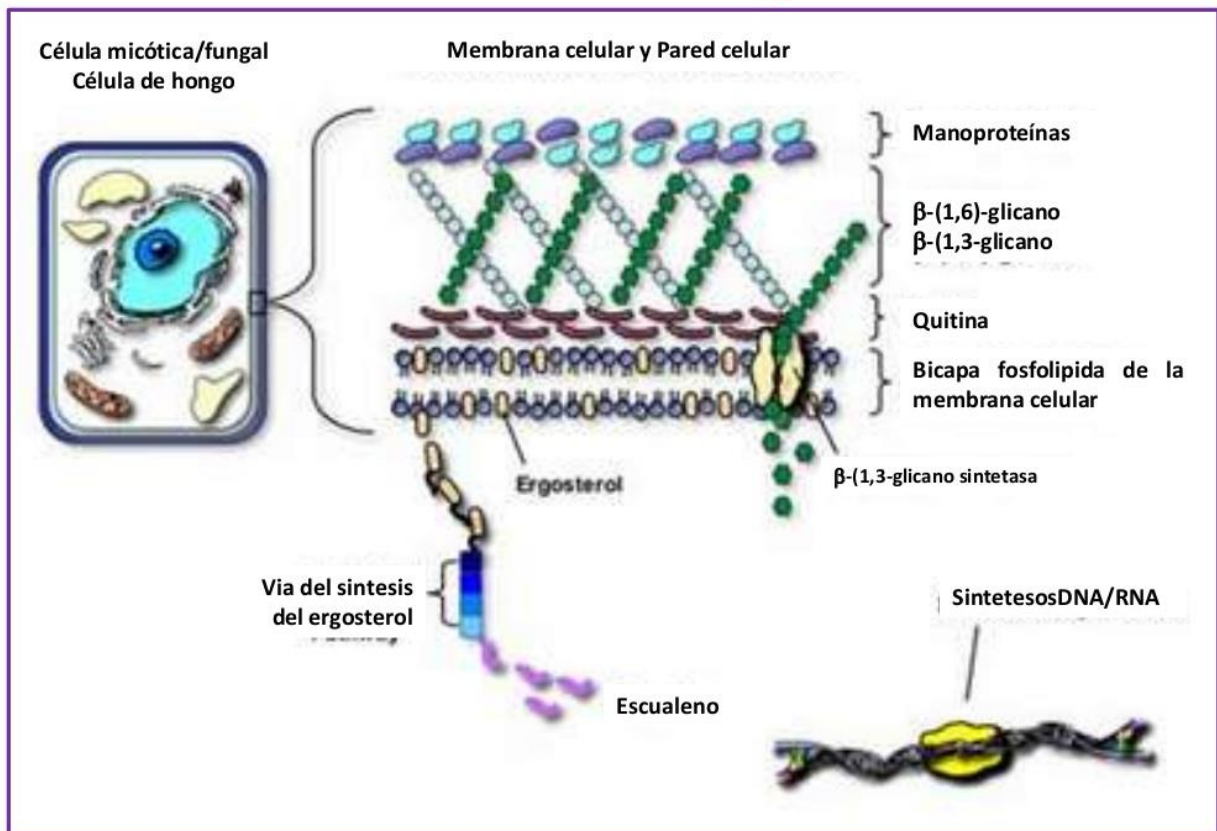


Figura 1. Pared celular fúngica.

Fuente: (Sanchez, 2009)

Dan positivo a la prueba de intradermorreacción las personas infectadas con el hongo *Sporothrix schenckii*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La esporotricosis es una micosis cutánea que se adquiere al manipular materiales vegetales como rosales, árboles, y tierra abonada; se presenta a menudo en las manos y antebrazos cuando el paciente se lesiona por pinchazos, arañazos, etc. provocados por dichos materiales vegetales. A través de esta lesión ingresa el hongo *S. schenckii*, sigue los vasos linfáticos apareciendo pequeñas úlceras en filas sobre la piel a medida que la infección avanza por un brazo o una pierna. Estas lesiones no sanan y pueden permanecer por años. La inhalación de esporas al manipular tierra abonada puede provocar esporotricosis generalizada (sistémica), esta puede causar problemas respiratorios y pulmonares, infección del hueso, artritis e infección del sistema nervioso. (Rubio, 2010)

Esta enfermedad se manifiesta con la aparición de lesiones ulcerosas, en el lugar de la lesión provocada por el material vegetal, por lo cual las personas afectadas son los trabajadores de viveros, agricultores, leñadores, etc.; es decir, personas que por lo general no viven en la ciudad si no en zonas alejadas rurales, en el campo; estas personas tienen la necesidad de un diagnóstico rápido y certero que pueda conducir a un tratamiento rápido para poder retornar a su lugar de trabajo, además, la presencia de lesiones es altamente perjudicial para desarrollar sus actividades de trabajo.

Actualmente, el diagnóstico de esporotricosis se realiza por medio de cultivo, el cual proporciona un resultado en un lapso de 8 a 15 días, por lo tanto, es importante contar con un método de diagnóstico como es la intradermorreacción que pueda arrojar resultados para diagnóstico rápido y específico.

Por otra parte, entre los diferentes tipos de manifestaciones clínicas de Leishmaniasis existe la Leishmaniasis esporotricóide, la cual presenta lesiones muy similares a la esporotricosis y en la actualidad no se cuenta con pruebas de diagnóstico diferencial para estas dos patologías, por lo que resulta importante

contar con una prueba de diagnóstico rápido y específico que pueda hacer un diagnóstico diferencial entre ambas, esto representaría un beneficio tanto para médicos dermatólogos como para pacientes.

3. JUSTIFICACIÓN

En La Paz existe una frecuencia de un caso de Esporotricosis al mes con un incremento de hasta tres casos al mes en época de primavera y verano, según los registros del Laboratorio de Micología del Hospital General de la ciudad de La Paz, en los años 2013-2015. Si bien esta frecuencia no es muy significativa es muy probable que exista un número igual que no son reportados, por lo que la importancia de la elaboración de este antígeno, además del diagnóstico rápido de Esporotricosis, está en el diagnóstico diferencial de Leishmaniasis ya que las lesiones de ambas patologías muestran mucha similitud, y la frecuencia de Leishmaniasis en Bolivia aumenta en un 20% cada año, con registro en el año 2015 de 300 casos. (Zapana, 2015)

El diagnóstico micológico de Esporotricosis es difícil de realizar en lo que respecta a la observación directa del material obtenido de la lesión puesto que en éste exámen la sensibilidad es muy baja y alcanza solo el 5% de los casos, los estudios histopatológicos tampoco resultan de gran ayuda ya que detectan el 8% de los casos y el cultivo micológico da un diagnóstico específico, sin embargo, tarda de 8 a 15 días en dar un resultado.

El diagnóstico serológico tiene como problema las reacciones cruzadas con otros agentes causales de micosis, especialmente de las micosis gomosas.

Esta prueba intradérmica permite el diagnóstico tan solo en 48 horas y los resultados dan positivo en el 95% de los casos.

En pacientes con Leishmaniasis esporotricóide las lesiones son muy similares a las lesiones de esporotricosis, con el uso de este antígeno se podrá realizar un diagnóstico diferencial efectivo y rápido.

Las ventajas de la intradermorreacción con Esporotricina son las siguientes: Sensibilidad mayor al 99%; Especificidad 98%; solo da positivo en pacientes con

Esporotricosis, no da positivo en pacientes con Leishmaniasis ni con ninguna otra micosis cutánea.

La desventaja de la intradermorreacción con esporotricina es la administración de la misma, ya que produce un pequeño dolor local por lo que el paciente se resiste a su administración, y la presencia de algunas molestias posteriores como dolor, prurito y calor local.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

- ❖ Obtener el antígeno de Esporotricina a partir de un cultivo de *Sporothrix schenckii* para el diagnóstico rápido y específico de infecciones causadas por *Sporothrix schenckii*, así como su uso en el diagnóstico diferencial de Leishmaniasis.

4.2 Objetivos específicos.

- ❖ Obtener un cultivo de *Sporothrix schenckii* que nos permita acceder al material biológico.
- ❖ Replicar el cultivo del hongo para luego elaborar el antígeno.
- ❖ Elaborar el Antígeno de *Sporothrix schenckii* a partir de la pared celular del hongo.
- ❖ Determinar la concentración aproximada del Antígeno Esporotricina elaborado.
- ❖ Verificar la no infectividad e inocuidad del antígeno esporotricina en cultivos y en animales de laboratorio.

5. ANTECEDENTES

La utilización de extractos antigénicos del hongo *Sporothrix schenckii* para reacciones intradérmicas basadas en hipersensibilidad retardada como ayuda diagnóstica en esporotricosis ha sido investigada y utilizada en Latinoamérica desde principios del siglo XX.

En 1909 Bloch realizó un experimento con una suspensión de conidias de *S. schenckii* como extracto antigénico para reacción intradérmica, sin embargo en 1954, Padilla demostró reacciones cruzadas con otras micosis, y por este motivo el método dejó de utilizarse debido a su baja especificidad.

Más tarde en 1947 otros investigadores llamados González y Soto obtuvieron una fracción antigénica polisacárida a partir de cultivos de *S. schenckii* en fase miceliar; y en 1950, Neves investigó un extracto de este hongo con la diferencia de que usó el hongo en fase levaduriforme. Con este extracto antigénico de fase levaduriforme, otros investigadores en 1962 y 1963 detectaron la presencia de reactores cutáneos.(H. VELEZ, 1984)

Nielsen en 1968 llegó a la conclusión que el potencial antigénico necesario para reacciones intradérmicas extraído de la fase de levadura de *Sporothrix schenckii* es similar independientemente de si la extracción era de la levadura completa o solamente de la pared celular. Las características estructurales e inmunoquímicas del antígeno de levadura fueron descritas más tarde en 1971 por Kenneth, describiendo que se trata de un complejo péptido-ramnosa-manosa altamente sensible y específico(H. VELEZ, 1984)

Según informes, en Louisiana EUA en 1964, se utilizó un antígeno metabólico de la fase levaduriforme, y se demostró positividad para esporotricosis de 11.2% en pacientes hospitalizados y 32% en empleados de viveros.(SCHNEIDAU J, 1964)

Según la literatura en Colombia se realizaron estudios donde se llegó a obtener un 91.4% de positividad y un 100% de especificidad en pacientes con esporotricosis comprobada por cultivos(H., 1968)

En Bolivia se utilizó el antígeno esporotricina elaborado en el instituto INLASA con sensibilidad del 99% y especificidad del 98% en pacientes con esporotricosis comprobada, hasta el año 1999.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Esporotricosis:

6.1.1 Historia

El hongo *Sporothrix schenckii* fue aislado por primera vez en el año 1898 por un estudiante de medicina llamado Benjamín Schenck, en un hospital de Baltimore (Estados Unidos), el aislamiento se realizó a partir de una lesión de brazo y mano derecha de otro estudiante; el aislamiento fue estudiado por el micólogo Erwin Smith quien concluyó que el hongo pertenecía al género *Sporotrichum*.

El segundo caso de aislamiento de este hongo fue en 1890, fue descrito por Hektoen y Percase en Estados Unidos; ellos le dieron el nombre de *Sporothrix schenckii*.

Años después en 1903 aparecieron descripciones de este hongo en Francia, fue aislado por Beuermann y Ramond del Hospital Saint Louis. (Stoichevich, 2014)

No se tienen datos del primer caso de esporotricosis en Bolivia, sin embargo, el caso más cercano es el primer caso descrito en Perú. Fue descrito por Edmundo Escomel en 1909 (Separata en enfermedades tropicales de Hugo Pesce).(Sanchez, 2009)

En 1907 en Brasil describen por primera vez el cuerpo asteroide y la posibilidad de aislar levaduras del hongo in vitro.

En 1961 Howard describe la transición dimórfica del hongo.

Finalmente en 1962 Carmichael reconoce la diferencia dentro del género *Sporotrichum*, el cual incluía hongos no dimórficos ni patógenos para el ser humano y los separa de los casos de esporotricosis.(Stoichevich, 2014)

6.1.2 Definición

La esporotricosis es una infección fúngica subaguda o crónica subcutánea granulomatosa, es causada por el complejo de especies *Sporothrix*, los cuales son hongos dimórficos, de estos, la especie más frecuente en humanos es *Sporothrix schenckii*. (Bonifaz, 2013).

Esta enfermedad se produce por la inoculación accidental del hongo a través de traumatismos o por inhalación de sus esporas al manipular materiales vegetales como rosales, zarzas o tierra abonada y también con la manipulación de troncos de árboles.

Esta enfermedad afecta a humanos y animales.

La enfermedad se caracteriza por la presencia de lesiones nodulares en la piel y tejido subcutáneo, sigue el trayecto linfático y ocasionalmente afecta a otros órganos, huesos y articulaciones (esporotricosis sistémica). Se localiza principalmente en extremidades superiores, extremidades inferiores y cara. (Hernandez, 2015)

6.1.3 Epidemiología

6.1.3.1 Población en riesgo

La esporotricosis es una enfermedad ocupacional que afecta a personas que están en constante contacto con materia orgánica y/o agrícola, como granjeros, horticultores, cultivadores de rosas, trabajadores de viveros, obreros de la industria y veterinarios; la enfermedad se produce cuando se lesiona la piel al manipular este tipo de materiales, o al cubrir con material vegetal infectado una lesión provocada con cualquier otro material; a través de la lesión ingresa el hongo. La Esporotricosis también se ha descrito por un arañazo de gato, picotazo de loro, mordedura de perro, picadura de insecto, manipulación de pescado y caza de armadillo. También es posible la transmisión por ropa contaminada, siempre que exista una lesión, e incluso se han descrito casos de transmisión madre-hijo por contacto directo de una lesión en el carrillo materno. (Ayats Ardite, 2005)

La Esporotricosis tiene una distribución geográfica universal, sin embargo, es característica de regiones tropicales y subtropicales, donde la temperatura media anual no rebasa los 39°C, donde hay lluvias abundantes en verano y heladas y granizadas ocasionales en invierno.

Las zonas endémicas reconocidas son: Latinoamérica; donde la mayoría de casos se reportan en Brasil, Perú, México, Colombia, Guatemala y Estados Unidos; y en otros continentes Japón, India y Sur de África.(Stoichevich, 2014)

La distribución de Esporotricosis según sexo no tiene relación directa, ya que dependerá de la actividad que realice el individuo sin tener mayor predisposición en hombres o en mujeres.

Según la edad, la esporotricosis predomina en adultos entre los 20 y 40 años; sin embargo, los niños también representan un grupo significativo ya que están expuestos a adquirir la infección durante los juegos al aire libre.

Según el factor socioeconómico, en general, la Esporotricosis tiene mayor prevalencia en las comunidades rurales donde existe un nivel socioeconómico bajo.

La Esporotricosis ha aumentado de manera importante en pacientes inmunocomprometidos, principalmente aquellos pacientes infectados con VIH, alcoholismo crónico y enfermedades concomitantes.(Romero, Reyes-Montes, Torres, & Ruiz-Baca, 2011)

Generalmente no se dan epidemias de esporotricosis, esta enfermedad se presenta como casos aislados o en pequeños grupos, como familias o compañeros de trabajo. Las epidemias son muy raras y cuando ocurren están relacionadas con una única fuente de infección.(Stoichevich, 2014)

La mayor epidemia descrita ocurrió en Sudáfrica entre los años 1941 y 1944, en 3000 trabajadores de una mina que fueron infectados durante sus actividades de trabajo.(Stoichevich, 2014)

6.1.3.2 Prevalencia

Según estudios realizados en otros países de Latinoamérica como Colombia se observa una prevalencia de 9-12 casos cada 100.000 habitantes. (Rubio, 2010)

En el caso de nuestro país no se tienen datos exactos ni se tienen estudios oficiales de prevalencia de esporotricosis, sin embargo, según los libros de registro del Laboratorio de Micología del Hospital General de la ciudad de La Paz, en la ciudad de La Paz en los años 2013-2015, se observa una prevalencia 1 a 3 casos de esporotricosis al mes con un incremento en los meses de primavera y verano, de los cuales la mayoría de los casos son pacientes provenientes de poblaciones de las provincias de los Yungas.

6.1.4 Agente etiológico

Los agentes etiológicos de Esporotricosis forman parte del complejo *Sporothrix*, las especies descritas hasta el momento son 6: *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* y *S. schenckii*; de las cuales la especie predominante y que causa la esporotricosis en humanos es *S. schenckii*.(Hernandez, 2015)

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Eucomycetes
Orden	Ophiostomataceae
Familia	Ophiostomataceae
Genero	Sporothrix
Especie	schenckii

Tabla 1. Taxonomía de *Sporothrix schenckii*

Fuente: (scribd.com/doc/55693777/esporotricosis)

6.1.4.1 Características generales de *Sporothrix schenckii*.

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico que crece de forma filamentosa a temperaturas menores a los 37°C y de forma levaduriforme a 37°C en medios enriquecidos y en los tejidos infectados.(Ayats Ardite, 2005).

La morfología que se observa en cultivos en medios enriquecidos es la siguiente:

Morfología macroscópica en fase micelial: colonia de crecimiento rápido, de aspecto membranoso, frecuentemente con pliegues radiales, inicialmente de color blanco o beige, que con el tiempo tiende a pigmentarse.

Morfología microscópica en la fase micelial (infectante): hifas finas (1- 3 µm de diámetro), ramificadas, hialinas, septadas con conidióforos de 10 - 30 µm de largo, de las que nacen conidios ovoides o piriformes dispuestos en forma de “pétalos de margarita o flor de durazno” (simpoduloconidios); algunos conidios nacen directamente del tallo de la hifa (raduloconidios) de 3 - 5 micras. Los conidios de forma triangular se presentan generalmente en los cultivos pigmentados.

Morfología macroscópica fase levaduriforme (parasitaria): colonias cremosas, blanco amarillentas, ligeramente acuminadas, similares a las colonias bacterianas.

Morfología microscópica fase levaduriforme (parasitaria): levaduras de forma variable; redondas, ovoides, fusiformes, con gemación única o múltiple, con tamaño promedio de 1-3 x 3-10 µm. (Hernandez, 2015)

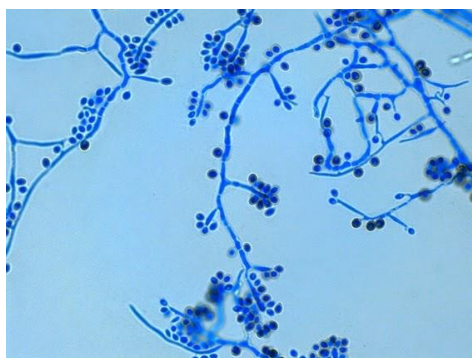


Figura 2. Morfología microscópica de *Sporothrix schenckii*. Se observan hifas finas, ramificadas, septadas y con conidióforos de los que nacen conidios dispuestos en forma de pétalos de margarita.

Fuente: (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2015/05/sporothrix-schenckii-complex-revisited.html>)



Figura 3. Colonias de cultivo de *Sporothrix schenckii*. Se observan colonias de aspecto membranoso con pliegues radiales de color blanco.

Fuente: (Trujillo, 2013)

6.1.4.2 Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *S. schenckii* son: dimorfismo, termotolerancia, antígenos celulares, producción de melanina, producción de peróxido de ergosterol, y la presencia de moléculas de adhesión.

Dimorfismo

El dimorfismo es la capacidad de algunos agentes fúngicos de presentar una dualidad fenotípica unida a un proceso de diferenciación celular, que puede estar relacionada a mecanismos de patogenicidad debido a los cambios ambientales como temperatura, humedad, pH, nutrientes, disponibilidad de oxígeno, etc. Ya que el hongo en respuesta a estos modifica su fisiología y morfología de manera tal que pueda enfrentar las nuevas condiciones fisiológicas y evadir la respuesta inmunológica del hospedero (Szaniszlo, 1985). El dimorfismo les permite sobrevivir tanto en la naturaleza como en el hospedero al que ingresan.

Termotolerancia

La habilidad del hongo de multiplicarse a temperaturas elevadas como 37°C lo hace un factor de virulencia ya que puede infectar mamíferos e incluso producir compromiso linfático y visceral. Este factor no está presente en todas las cepas, las cepas que carecen de este no comprometen sistema linfático ni vísceras, simplemente dan lugar a formas fijas de la enfermedad.(Stoichevich, 2014)

Antígenos celulares

Presenta dos tipos de antígenos: uno de la fase micelial (antígeno micelial) y el otro proveniente de la fase levaduriforme (antígeno levaduriforme). Básicamente la composición química de ambos es la misma: un glucopéptido y una parte polisacárida que contiene manosa, galactosa, glucosa y L- ramnosa; este último carbohidrato marca la diferencia entre ambos antígenos, ya que un número muy reducido de hongos patógenos contienen ramnosa como componente de su pared celular, una de las características que le dan su especificidad.

En general, la fracción polisacárida antigénica está formada, entre otros polisacáridos, por ramnomananas, y una de las diferencias entre el antígeno micelial y el antígeno levaduriforme es que el primero está constituido por diramnosil-ramnomananas y el segundo por monoramnosil-ramnomananas.(Bonifaz, 2013)

Esta fracción polisacárida es la que le da antigenicidad al hongo, desencadenando una respuesta inmunitaria principalmente de tipo celular e interviniendo en los procesos de adhesión a las células del huésped.(Stoichevich, 2014)

Producción de melanina

Esta se produce en el citoplasma y se deposita en la pared celular y le confiere al hongo la capacidad de retener y neutralizar radicales libres, da resistencia contra radiaciones UV, rayos X, gamma, calor o frío.(Hogan HL, 1996)

Producción de peróxido de ergosterol

Este actúa como un mecanismo de protección para evadir las especies reactivas del oxígeno durante la fagocitosis.(Stoichevich, 2014)

Enzimas

S. schenckii tiene la capacidad de invadir piel y tejido cutáneo gracias a las proteinasas.

La fosfatasa ácida es producida por conidios, micelio y levaduras, esta enzima juega un papel importante en la interacción de levaduras con los macrófagos y algunas otras células del hospedero. (Hogan HL, 1996)

Moléculas de adhesión

Estas se encuentran en la superficie del hongo y son similares a la integrina, permiten la adherencia a moléculas de la matriz extracelular del huésped como la fibronectina, laminina y colágeno de tipo II. (Stoichevich, 2014)

6.1.4.3 Fisiopatogenia

La fisiopatogenia de la Esporotricosis esta mediada por dos factores: la virulencia del agente infectante (*S. schenckii*); y la respuesta inmune del hospedero; esta segunda determina la evolución de la infección.(Stoichevich, 2014)

- ❖ **Vía de ingreso:** la principal vía de ingreso es la vía cutánea, el agente ingresa de forma directa a través de traumatismos o excoiaciones con material contaminado como vegetales, tierra, suelo o mordedura o arañazo de animales vectores que llevan las conidias de *Sporothrix* en los dientes y uñas. En algunos casos se ha observado el ingreso del agente a través de picadura de insectos. Con menos frecuencia el agente ingresa por vía aérea por inhalación de conidias al manipular tierra contaminada, esto da origen a la forma pulmonar de esporotricosis.(Stoichevich, 2014)

El elemento infectante es la conidia en fase filamentosa.

- ❖ **Virulencia de *S. schenckii*:** la virulencia del agente infectante esta mediada por los factores mencionados anteriormente: dimorfismo, termotolerancia,

antígenos celulares, producción de melanina, producción de peróxido de ergosterol, acción de enzimas y las moléculas de adhesión. Estos permiten la supervivencia del hongo en el organismo en el lugar de la inoculación.(Stoichevich, 2014)

- ❖ Respuesta inmunitaria: una vez en el tejido, las conidias se transforman en elementos levaduriformes y desencadenan una respuesta inmune innata y adaptativa:

La respuesta inmune innata se lleva a cabo con la activación del sistema del complemento, especialmente la vía alternativa; esto permite la fagocitosis del hongo mediante la fracción C3b que se deposita en la pared celular del hongo.

La respuesta inmune celular se basa en la activación de los macrófagos por los linfocitos T CD4, los cuales liberan Interferón gamma; este induce al macrófago para la producción de óxido nítrico, que tiene una elevada actividad citotóxica frente a *S. schenckii*; esto resultaría favorable para la eliminación del hongo, sin embargo, esto no es inmediato, si no que se da unos dos meses después de producida la infección. No obstante, en las etapas tempranas, los niveles elevados de TNF- γ y óxido nítrico se vinculan con la depresión de la actividad de células T, mediante la IL 10, favoreciendo la reproducción del hongo y la infección del huésped.(Bastos de Lima, 2011)

La respuesta inmune humoral se presenta con la producción de IgG, IgM e IgA frente a distintos antígenos de la fase micelial de *S. schenckii*.

❖ Patogénesis

Por lo explicado anteriormente, tanto sobre la virulencia del agente infectante como sobre la respuesta inmune del hospedero, el hongo *S. schenckii* logra sobrevivir en el tejido inoculado.

Una o dos semanas posteriores a la inoculación del hongo, en el lugar de la inoculación se desarrolla inicialmente una pápula, que se transforma en un nódulo móvil y duro, este nódulo tiende a reblandecerse y ulcerarse, formando

así el llamado chancro de inoculación o chancro esporotricoide. En aproximadamente 10 días, como resultado de la interacción de la respuesta inmune se desarrolla el complejo cutáneo-linfático; a partir del cual la enfermedad puede seguir dos cursos: en un porcentaje más bajo, se puede presentar involución de las lesiones y cura espontánea, o bien la lesión se extiende (mayoría de casos) por continuidad. Los vasos linfáticos se inflaman y aparecen lesiones nodulares ascendentes a lo largo de la vía linfática. Algunas lesiones pueden secretar material purulento y formar placas verrugosas crónicas o lesiones gomosas escalonadas, que afectan los vasos linfáticos regionales y se detienen en el linfático mayor (cuello, axila, ingle). Alteraciones fisiológicas o inmunológicas permiten la diseminación fúngica hacia otros sitios.(Arenas, 2004)

En la Esporotricosis pulmonar, después del primo-contacto donde el hongo ingresa por vías respiratorias, se presenta esporotricosis pulmonar primaria, como un cuadro neumónico, siendo con frecuencia asintomático al principio, posteriormente se produce hipersensibilidad específica, y posteriormente neumatía limitada o progresiva con diseminación hematógica llevando a la diseminación sistémica.



Figura 4. Mecanismo de infección de *Sporothrix schenckii*. Se observa el pinchazo con una espina de rosal, la aparición de una pequeña pápula en el lugar de la lesión, y el avance de la infección por vía linfática.

Fuente: <http://www.slideshare.net/GabrilaBIn/clase-10-esporotricosis-y-cromoblastomycosis-2015-57406181>

6.1.4.4 Proteínas de la pared celular de *Sporothrix schenckii* como moléculas Inmunoprotectoras.

La pared celular de *S. schenckii* está compuesta por varias moléculas, entre las que se encuentran las moléculas antigénicas: glucopéptidos y polisacáridos, la parte polisacáridica contiene manosa, galactosa, glucosa y L-ramnosa; este último carbohidrato es el que le da la especificidad antigénica ya que solamente un número muy reducido de hongos patógenos contienen ramnosa como componente de su pared celular. (Bonifaz, 2013).

La fracción polisacárida antigénica está formada, entre otras moléculas, por ramnomananas, un polímero cuyas cadenas están constituidas por un enlace α -1,6 –manosil unido a ácido α -D glucurónico.

El péptido ramnomanana se puede separar en dos fracciones en función a su afinidad con la lectina concanavalina A (Con-A); la fracción que se une con concanavalina A (Con-A), es relevante para el diagnóstico de esporotricosis en humanos porque el péptido es reconocido por el 100% de los sueros de pacientes

que sufren esporotricosis cutánea; en otras formas de esporotricosis, la misma fracción demuestra 90% de sensibilidad y 86% de especificidad. (Carlos Alba-fierro, 2013)

Existen dos glicoproteínas nombradas como GP60 y GP70 que se ha demostrado que son el componente más inmunogénico de la pared celular del hongo *S. schenckii*; especialmente GP70, está implicada en la adhesión durante la interacción huésped-patógeno; disminuye la capacidad fúngica de adherirse a componentes de la matriz extracelular dérmica. Sin embargo, la relación de estas glicoproteínas con la respuesta inmune del huésped y la evolución de la esporotricosis son desconocidas. (Carlos Alba-fierro, 2013)

6.1.5 Clasificación esporotricosis

La esporotricosis es una enfermedad polimorfa, cuyas manifestaciones clínicas dependen del mecanismo de inoculación, tamaño del inóculo, estado inmunológico del huésped, tolerancia térmica y la patogenicidad de la cepa entre otros factores.

En general la esporotricosis se clasifica en dos grupos: cutánea y extracutánea; dentro de la esporotricosis cutánea existen varios tipos: cutánea linfática, cutánea fija, cutánea diseminada y cutánea superficial; dentro de la esporotricosis extracutánea se encuentran: pulmonar, visceral y osteoarticular entre otras. Existen además otras formas especiales de esporotricosis de presentación poco frecuente, estas solo se presentan en zonas endémicas con gran número de casos. (Stoichevich, 2014)

Formas cutáneas:

- ❖ Forma cutánea linfática: la forma cutánea linfática es la forma más frecuente de esporotricosis (75% de los casos); esta se inicia en el lugar de la inoculación traumática, con la aparición de una lesión papulonodular eritematosa, generalmente indolora que crece durante días o semanas; el tiempo de incubación es de 3 semanas pero puede durar hasta meses. Las lesiones pueden ser lisas o verrucosas con tendencia a la ulceración, supuración y desarrollo de bordes eritematosos en ambos casos. Pueden presentarse en cualquier parte del cuerpo, sin embargo, con frecuencia se presenta en las

extremidades superiores e inferiores y en la cara debido a la exposición de las mismas. Pueden desarrollarse adenopatías regionales o locales y la lesión tiende a diseminarse siguiendo el trayecto linfático. Estas lesiones secundarias tienen una evolución similar a la inicial pero con tendencia a ser más granulomatosas y persistir durante más tiempo. (Ayats Ardite, 2005)



Figura 5. Fotografía de paciente con esporotricosis cutáneo linfática. Se observa la diseminación de la infección con la aparición de pápulas, algunas ulceradas que siguen el trayecto linfático.

Fuente: http://www.infectologia.edu.uy/images/stories/pdf/7_casosclinicos/2012/nov/cc_9nov2012_ESPOROTRICOSIS.pdf

- ❖ Forma cutánea fija: esta se produce por reinfección en pacientes que han desarrollado inmunidad frente a *S. schenckii*. Se caracteriza por una sola placa infiltrada, verrucosa o vegetante, que se queda en el lugar de la inoculación, puede ulcerarse y cubrirse con costras melicericas, rodeada de un halo eritematovioláceo.



Figura 6. Fotografía de extremidad superior de paciente con esporotricosis cutánea fija. Se observa la placa verrucosa, en un solo lugar, rodeada del halo eritematovioláceo.

Fuente: (Aranzazu, 2007)

- ❖ Forma cutáneo superficial: esta es una variante de la forma cutáneo fija; se caracteriza por placas eritemato-escamosas violáceas y pruriginosas que se manifiestan generalmente en la cara.



Figura 7. Fotografía de paciente con esporotricosis cutáneo superficial en la cara. Se observan las placas eritemato-escamosas violáceas.

Fuente: (Aranzazu, 2007)

- ❖ Forma cutánea diseminada: esta forma afecta a diferentes regiones de la piel en forma de abscesos, úlceras o fístulas, sin compromiso de órganos extracutáneos.

Esta es poco frecuente y está vinculada con estados de inmunosupresión; está asociada con VIH/SIDA, diabetes, neoplasias hematológicas y estados de inmunosupresión parcial como el alcoholismo, embarazo, desnutrición y corticoterapia. (Stoichevich, 2014)



Figura 8. Esporotricosis cutáneo diseminada o hematógena. Se observa varias regiones del cuerpo en las que se presentan abscesos o úlceras.

Fuente: (Amado, 2011)

Formas extracutáneas:

- ❖ Osteoarticular: esta puede ser producida por diseminación hemática en huéspedes inmunocomprometidos o por contigüidad a partir de una lesión cutánea. Produce artritis destructiva y osteolítica, sinovitis o periositis, principalmente en los huesecillos del carpo, metacarpo y tibia, radio-cúbito, fémur y costillas, ocasionando dolor, tumefacción articular y limitación de movilidad articular.



Figura 9.Esporotricosis osteoarticular dolorosa de muñeca y dedos de la mano en paciente VIH positivo.

Fuente: (Carrada, 2012)

- ❖ Pulmonar: esta es causada por la inhalación de las esporas, sigue un curso semejante al de la tuberculosis; ingresa por vía respiratoria, produce primoinfección permaneciendo asintomáticos 98% de los pacientes, en el otro 2% se producen formas pulmonares progresivas, especialmente el pacientes inmunocomprometidos. Produce neumonitis lobar, pleuritis y lesiones cavitadas de pared delgada.



Figura 10. Esporotricosis pulmonar observada en un carpintero. Se observan dos lesiones cavitadas con pared delgada.

Fuente: (Carrada, 2012)

- ❖ Ocular: esta es de baja frecuencia, compromete principalmente párpados, conjuntiva y aparato lacrimal con lesiones ulcerosas y gomosas; puede presentarse acompañado de lesiones cutáneas.
- ❖ Meníngea: esta puede presentarse como una meningitis crónica aislada, o aparecer en el contexto de una forma sistémica diseminada. En el LCR se encuentra linforraquia, niveles elevados de proteínas y glucosa disminuida.
- ❖ Sistémica Diseminada o Generalizada: esta se comporta como una infección oportunista en huéspedes inmunocomprometidos con afectación de órganos internos en el contexto de una fungemia. Sus manifestaciones clínicas son: fiebre, malestar general, anorexia, pérdida de peso, dolor y deformidad articular, puede haber compromiso pulmonar concomitante. (Stoichevich, 2014)

6.1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de esporotricosis en general se basa en la clínica, la epidemiología y datos de laboratorio; siendo el método estándar para el diagnóstico en laboratorio el cultivo micológico. Las otras técnicas de diagnóstico complementarias son: histopatología, exámen directo, la intradermorreacción, pruebas serológicas y amplificación de ADN mediante Reacción en cadena de polimerasa.

6.1.6.1 Cultivo micológico

Para realizar el cultivo micológico se toma la muestra del material purulento de la lesión ulcerosa.

Una vez obtenida la muestra se realiza un exámen en fresco donde se pueden observar las levaduras en forma de habano intracelulares, aunque generalmente estas no se observan, ya que estas solo son encontradas en las etapas más tempranas de la infección; lo que generalmente se observa son los cuerpos asteroides, que si bien no son exclusivos de la esporotricosis, su presencia acompañada de la clínica permite un alto índice de sospecha.

Para comprobar la sospecha se realiza el cultivo.

El cultivo micológico se realiza en medio Sabouraud-dextrosa agar a 25 – 28°C; donde después de 3 a 5 días se observan colonias filamentosas de color blanco o cremoso que a los pocos días toma color marrón claro o negro; (Ayats Ardite, 2005) en la observación microscópica de estas colonias se observa micelios delgados, hialinos septados y ramificados o en haces; las conidias se disponen en forma de margarita agrupadas sobre un talluelo o conidióforo. En la fase levaduriforme se observan levaduras ovoides. (Stoichevich, 2014)

La demostración del dimorfismo permite confirmar la identificación de la especie *S. schenckii*, para esto el hongo debe inocularse en un tubo con agar sangre inclinado o con agar BHI en ambiente húmedo a 37°C, se observa el crecimiento en forma de levadura, así como la observación microscópica de levaduras ovoides o globosas. (Ayats Ardite, 2005)



Figura 11. Colonia de *Sporothrix schenckii*, crecida en ADS, a 7 días y temperatura ambiente. Fuente: (Hernandez, 2015)

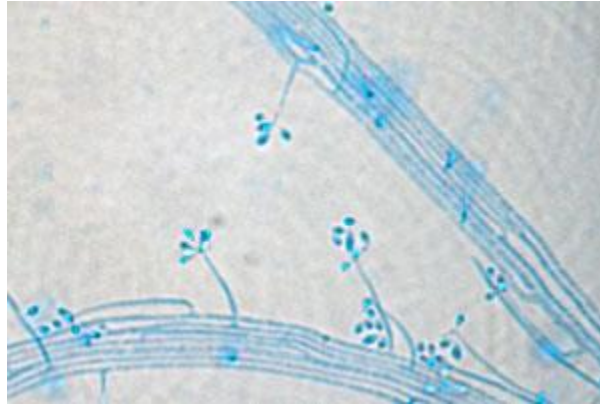


Figura 12.Examen microscópico de *Sporothrix schenckii*. Hifas finas, conidióforos largos y conidios simpodiales organizados en forma de flor de margarita (40X). Fuente: (Hernandez, 2015)

6.1.6.2 Estudio Histopatológico

Según este tipo de estudio, debe sospecharse de esporotricosis en presencia de Hiperplasia pseudoepiteliomatosa y reacción granulomatosa epiteliode-piogénica. Cuando la biopsia se toma de un nódulo el infiltrado se dispone de una manera clásica: una zona periférica o sifiloide, constituida por plasmocitos, linfocitos, fibroblastos y acentuada neoformación vascular, una zona media o tuberculoide que está formada por células gigantes multinucleadas de tipo langerhans y de cuerpo extraño, finalmente una zona central o supurativa crónica donde se hallan microabscesos de polimorfonucleares; es en esta zona central del granuloma donde pueden encontrarse los cuerpos asteroides.

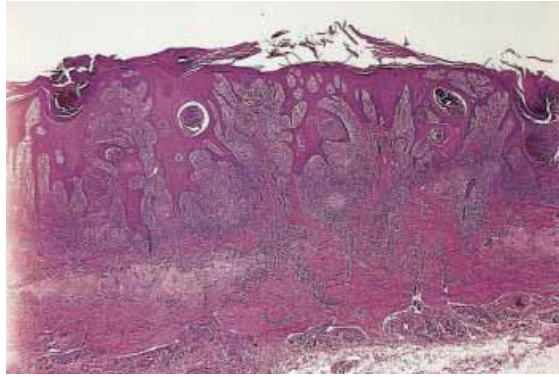


Figura 13. Esporotricosis localizada. Biopsia de piel. Hiperplasia pseudoepiteliomatosa epidérmica
Fuente: (Carrada, 2012)

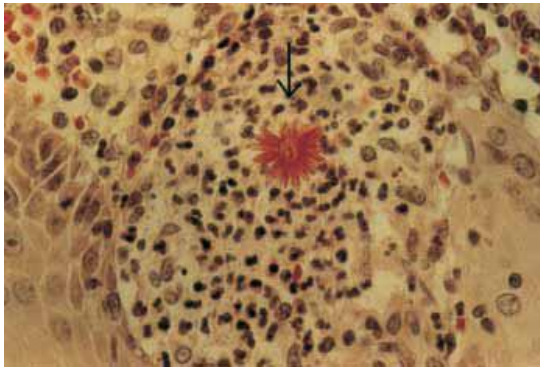


Figura 14. Esporotricosis linfangítica. Se observa granuloma con abundantes neutrófilos, células epitelioides y linfocitos. Se observa la presencia del cuerpo asteroide eosinofílico característico.
Fuente: (Carrada, 2012)

6.1.6.3 Amplificación del ADN mediante PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Este método resulta útil cuando solo se puede tomar una pequeña muestra para analizar, sin embargo, está en estudio su especificidad y sensibilidad.

6.1.6.4 Pruebas serológicas

Entre estas existe las pruebas de aglutinación en látex, la cual permite la determinación de anticuerpos IgM en el suero del paciente, facilita el diagnóstico

mayormente en esporotricosis diseminada, su sensibilidad es del cerca al 100% y su especificidad del 54%, da falsos positivos en pacientes sanos y reacciones cruzadas con otras micosis profundas.

Otra prueba serológica utilizada es el test de ELISA, que se basa en la detección de anticuerpos IgG en el suero del paciente, también ha sido utilizada exitosamente en líquido cefalorraquídeo y sinovial. Al igual que la aglutinación en látex permite dar un diagnóstico rápido en formas de esporotricosis atípicas, diseminadas o en lesiones que no pudieron ser confirmadas por otros métodos. Su sensibilidad es del 90%(Stoichevich, 2014)

6.1.6.5 Intradermorreacción con Esporotricina:

Se desarrollará más adelante.

6.1.7 Tratamiento

El tratamiento de Esporotricosis se realiza a base de: medidas locales como termoterapia, Yoduro de potasio, Azoles, Polienos (Anfotericina B) y Alilaminas.

6.1.7.1 El Yoduro de Potasio.

Es el tratamiento de primera línea ya que es un tratamiento eficaz y de bajo costo, sin embargo, este no es eficaz en esporotricosis osteoarticular, pulmonar o diseminada.

Este necesita un sistema inmunológico íntegro ya que actúa estimulando la función de los macrófagos. El tratamiento se inicia con 5 gotas 3 veces al día y se incrementa según tolerancia hasta 40-50 gotas 3 veces por día.

6.1.7.2 Azoles.

El intraconazol es la droga de elección para el tratamiento de las formas linfocutáneas y cutáneas fijas; se administra en forma continua en dosis de 200mg por día hasta 2 a 4 semanas posteriores a la resolución completa de las lesiones.

6.1.7.3 Alilaminas.

Terbinafina: Estas se usan como tratamiento alternativo del itraconazol en pacientes polimedicados.

6.1.7.4 Polienos. Anfotericina B

Este es el tratamiento de elección en las formas extracutáneas y diseminadas, es muy tóxica. Se prescribe en dosis de 0.7 a 1 mg/kg/día.

6.1.7.5 Termoterapia local

Se da en situaciones fisiológicas especiales como embarazo, lactancia y la intolerancia a otros medicamentos. Se realiza la diferencia de calor local que evita la diseminación del hongo.(Stoichevich, 2014)

6.1.8 Esporotricina

6.1.8.1 Generalidades

La esporotricina es el antígeno obtenido a partir del hongo *Sporothrix schenckii*, es utilizado como intradermoreacción para el diagnóstico rápido y específico de esporotricosis.

Se consideran dos tipos de antígenos: metabólico y celular o somático. El antígeno metabólico es un glucopéptido obtenido de la pared celular del hongo, ya sea de la fase micelial o de la fase levaduriforme.

El antígeno celular o somático es la suspensión de levaduras muertas.

Ambos son útiles para el diagnóstico de esporotricosis, sin embargo la forma celular se utiliza para fines epidemiológicos, ya que la intradermoreacción que induce es positiva durante muchos años después de obtenida la curación clínica. Mientras que el antígeno metabólico es el de elección para apoyar el diagnóstico de la enfermedad, ya que este se vuelve negativo de uno a tres años de la curación clínica del padecimiento.(Rodriguez, 2008)

Este trabajo se centrará únicamente en la producción del antígeno de la fase micelial ya que este es más específico que el de la fase levaduriforme.

6.1.8.2 Antígenos celulares de *Sporothrix schenckii*

La pared celular del hongo *S. schenckii* contiene los antígenos celulares, considerados como uno de sus factores de virulencia. Debido al dimorfismo del hongo presenta dos tipos de antígenos: uno de la fase micelial y otro de la fase levaduriforme, llamados antígenos micelial y antígeno levaduriforme respectivamente. Básicamente la composición de ambos es la misma, consta de un glucopéptido y una parte polisacáridica formada por manosa, galactosa, glucosa y L-ramnosa, siendo esta última la que le da especificidad frente a otros hongos, ya que son muy pocos los hongos patógenos que contienen ramnosa como componente de la pared celular.

En general, la fracción polisacáridica antigénica está formada entre otros polisacáridos, por ramnomananas, estas diferencian los dos tipos de antígenos; el antígeno micelial está constituido por diramnosil-ramnomananas y el antígeno levaduriforme está constituido por monoramnosil-ramnomananas. (Bonifaz, 2013)

El antígeno micelial es el utilizado para reacción intradérmica.

Esta fracción polisacáridica es la que le da antigenicidad al hongo, desencadenando una respuesta inmunitaria principalmente de tipo celular e interviene en los procesos de adhesión a las células del huésped. (Stoichevich, 2014)

Esta propiedad antigénica es utilizada para realizar el diagnóstico de esporotricosis mediante reacción intradérmica, ya que el paciente que cursa la infección presenta esta respuesta inmunitaria necesaria para hacer evidente el diagnóstico.

6.1.8.3 Producción de la esporotricina

El uso de la esporotricina como intradermoreacción para diagnóstico se conoce desde 1947 con los trabajos de González-Ochoa.

Si bien el método no está estandarizado es de gran utilidad para el diagnóstico de esporotricosis ya sea cutánea o extracutánea.

El motivo por el que no se ha estandarizado la técnica es que esta enfermedad solo es significativa en países endémicos, los cuales son en su mayoría países de Latinoamérica, por lo que cada país elabora el antígeno según su requerimiento. (Bonifaz, 2013)

La obtención se realiza a través de un cultivo inicial de una cepa de referencia, el cual después de identificar su pureza se cultiva masivamente, se cosecha en ambiente estéril, se tritura obteniendo la pasta antigénica, la cual se centrifuga y finalmente se esteriliza por Tindalización.

Se deben realizar pruebas de esterilidad y no inocuidad, además de ajuste de densidad del antígeno que proporciona un aproximado de la concentración del mismo.

6.1.8.4 Cómo funciona

El antígeno obtenido se inocula de forma intradérmica, se inocula la cantidad de 0.1ml en la cara interna del antebrazo o en la espalda, una vez inoculado el antígeno se produce una reacción de Hipersensibilidad retardada, esta reacción provoca la aparición de una pápula eritematosa de un diámetro mayor a 5mm en la zona de la inoculación dentro de las 48 horas posteriores a la inoculación.

6.1.8.5 ¿Qué es intradermoreacción?

Una intradermoreacción es la aplicación de una sustancia por vía intradérmica buscando una respuesta inmunitaria positiva o negativa que lleven a contribuir en el diagnóstico, tratamiento, pronóstico, o los tres, de una enfermedad.

Las reacciones intradérmicas se clasifican en dos: no inmunitarias e inmunitarias; la intradermoreacción con esporotricina pertenece a las reacciones inmunitarias,

las cuales se realizan con bacterias, células fúngicas o extractos de estos, que funcionan como antígenos con la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria; esta respuesta inmunitaria puede ser inmediata o retardada; en el caso de la intradermorreacción con esporotricina se da una respuesta retardada, es decir, reacción de hipersensibilidad retardada.(Rodríguez, 2008)

❖ Hipersensibilidad retardada

La hipersensibilidad retardada se da por un mecanismo de inmunidad celular. Las células que participan son los linfocitos T.

De 4 a 8 horas después de ingresar la sustancia extraña induce vasodilatación y edema; así mismo se forma un infiltrado perivascular mixto en la dermis profunda, constituido por linfocitos e histiocitos, con algunos basófilos y neutrófilos. El antígeno es procesado por las células de Langerhans o los macrófagos y presentado al linfocito T; el linfocito T sufre numerosas mitosis del que se obtienen células de memoria, proceso conocido como transformación.

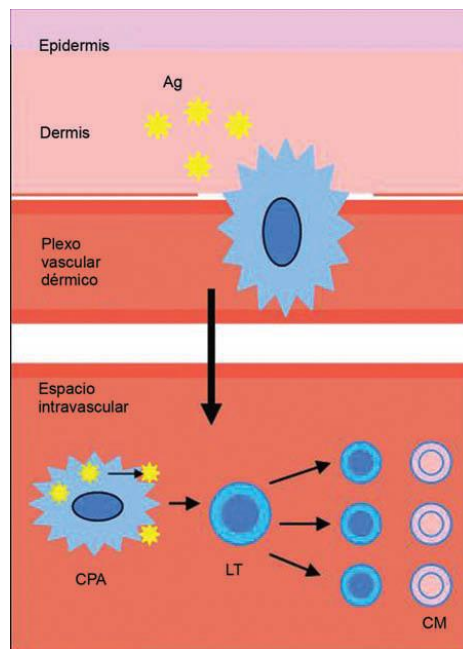


Figura 15. Antígeno presentado a LT y transformación a células de memoria. Fuente: (Rodríguez, 2008)

La segunda vez que el antígeno penetre la dermis (hecho que se da en la intradermorreacción) será presentado a los linfocitos T de memoria previamente sensibilizados, estos se multiplicarán y producirán linfocinas que actúan sobre neutrófilos, macrófagos y sobre otros linfocitos resultando en hipersensibilidad retardada; así mismo; se induce un aumento de la permeabilidad vascular y se activa el sistema de coagulación; la fibrina obtenida atrapa otras proteínas y constituye un gel, responsable de la induración observada en estas reacciones junto con los histiocitos y linfocitos.

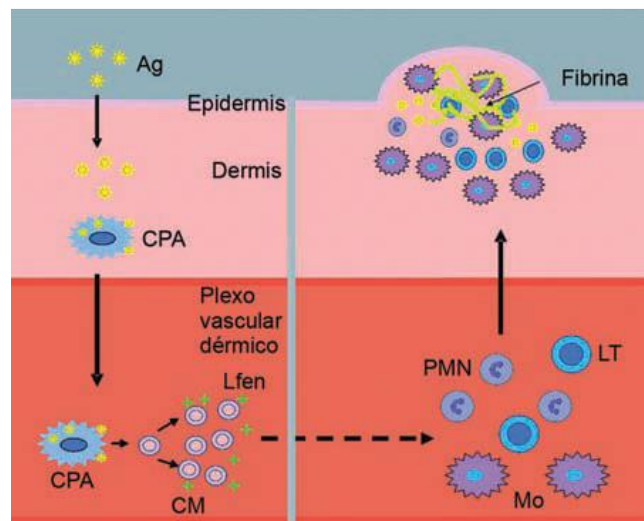


Figura 16. Fenómeno ocurrido en una prueba de intradermorreacción.
Segundo ingreso del antígeno y producción de la induración.

Fuente: (Rodríguez, 2008)

6.1.8.6 Criterios de diagnóstico

Los criterios de lectura son los siguientes:

- ❖ Se considera reacción positiva cuando el paciente presenta eritema con induración mayor o igual a 5mm
- ❖ Se considera reacción negativa cuando el paciente no tiene reacción o solamente presenta eritema.(Bonifaz, 2013)

6.1.8.7 Aplicaciones

Las aplicaciones del uso de Esporotricina de fase micelial son las siguientes: en primer lugar el diagnóstico rápido y específico de esporotricosis ya sea cutánea o extracutánea; es utilizada para conocer el estado inmunitario de un paciente.

6.1.8.8 Ventajas

Las ventajas de la intradermorreacción con esporotricina son las siguientes: sensibilidad mayor al 99%; Especificidad 98%; solo da positivo en pacientes con Esporotricosis, no da positivo en pacientes con Leishmaniasis ni con ninguna otra micosis crónica o cutánea. (H., 1968) (H. VELEZ, 1984)

6.1.8.9 Desventajas

Las desventajas de la intradermorreacción con esporotricina de fase micelial es la molestia de la administración del antígeno, la cual produce un pequeño dolor local por lo que el paciente puede resistirse a su administración, además puede tener algunas molestias posteriores como prurito, dolor o calor local.

6.2 Leishmaniasis

6.2.1 Descripción

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por la infección con un parásito protozoario del género *Leishmania*, de la familia Trypanosomatidae; aproximadamente se han identificado 30 especies de este género, de las cuales, al menos 20 son patógenas para los mamíferos. (University, 2010)

Esta enfermedad es transmitida por moscas de arena de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*; la Leishmaniasis se transmite a los humanos por la picadura de la hembra infectada.

6.2.2 Epidemiología

Los humanos y los animales domésticos son huéspedes incidentales para muchas especies de *Leishmania*, que se mantienen en ciclos entre animales silvestres y moscas de arena.

6.2.2.1 Distribución geográfica

Esta enfermedad es endémica principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, y la enfermedad en humanos se presenta fundamentalmente en África, partes de Asia, el Medio Oriente, América Latina (Sudamérica, Centroamérica y México) y la región mediterránea; en Europa la Leishmaniasis parece estar propagándose hacia el norte de su foco tradicional.

La distribución de cada especie de *Leishmania* condiciona el tipo de enfermedad que se presenta en cada región, al igual que su gravedad.

(University, 2010)(OPS, 2015)

6.2.2.2 Principales factores de riesgo

Los principales factores de riesgo para adquirir Leishmaniasis son:

- ❖ Condiciones socioeconómicas: la pobreza aumenta el riesgo de Leishmaniasis, las malas condiciones de vivienda y las deficiencias de saneamiento de los hogares pueden promover el desarrollo de los lugares de cría y reposo de los flebótomos y aumentar su acceso a la población humana. Además los flebótomos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una buena fuente de ingesta de sangre; además de otras pautas de comportamiento humano como el uso de mosquiteros o insecticidas.
- ❖ La malnutrición: las dietas bajas en proteínas, hierro, vitamina A, y zinc aumentan el riesgo de que la infección progrese.
- ❖ Movimiento de población: las epidemias a menudo se asocian con la migración y el desplazamiento de personas no inmunizadas a zonas donde ya existen

ciclos de transmisión; la exposición en el trabajo y el aumento de la deforestación también son factores importantes.

- ❖ Cambios ambientales: estos pueden influir en la incidencia de Leishmaniasis, entre estos esta la urbanización o el asentamiento en zonas boscosas.
- ❖ Cambio climático: la Leishmaniasis es sensible a las condiciones climáticas; los cambios en las precipitaciones, la temperatura y la humedad influyen en la enfermedad; las pequeñas fluctuaciones en la temperatura pueden tener un acusado efecto en el ciclo de desarrollo de los promastigotes de *Leishmania* en los flebótomos y permitir que el parásito se transmita en zonas anteriormente no endémicas.(OPS, 2015)

6.2.3 Etiología

Los vectores de la Leishmaniasis son mosquitos de los géneros: *Phlebotomus* y *Lutzomyia*.

Leishmania presenta 2 estados morfológicos, el promastigote, que está presente en forma extracelular y ubicado en el intestino de los mosquitos, se caracteriza por tener un cuerpo alargado y un flagelo que le permite el movimiento; esa forma al ser inoculada dentro del hospedero se transforma en el segundo estado morfológico, el amastigote, este se caracteriza por ser redondeado, sin presencia de flagelo con un núcleo y kinetoplasto.

6.2.3.1 Ciclo vital del parásito *Leishmania*

El mosquito hembra pica al ser humano transfiriendo los promastigotes metacíclicos, estos pueden invadir activamente los macrófagos, granulocitos, o ser fagocitados; los promastigotes se transforman en amastigotes y se multiplican por mitosis, dejan las células infectadas e infectan nuevos macrófagos; luego los amastigotes que se encuentran en las células se transfieren al mosquito durante la picadura y se liberan en el intestino del mosquito, los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, estos se multiplican por mitosis pasando a promastigotes metacíclicos, los cuales migran a la válvula faríngea y son transmitidos al humano mediante la picadura. (Saldaña, 2004)

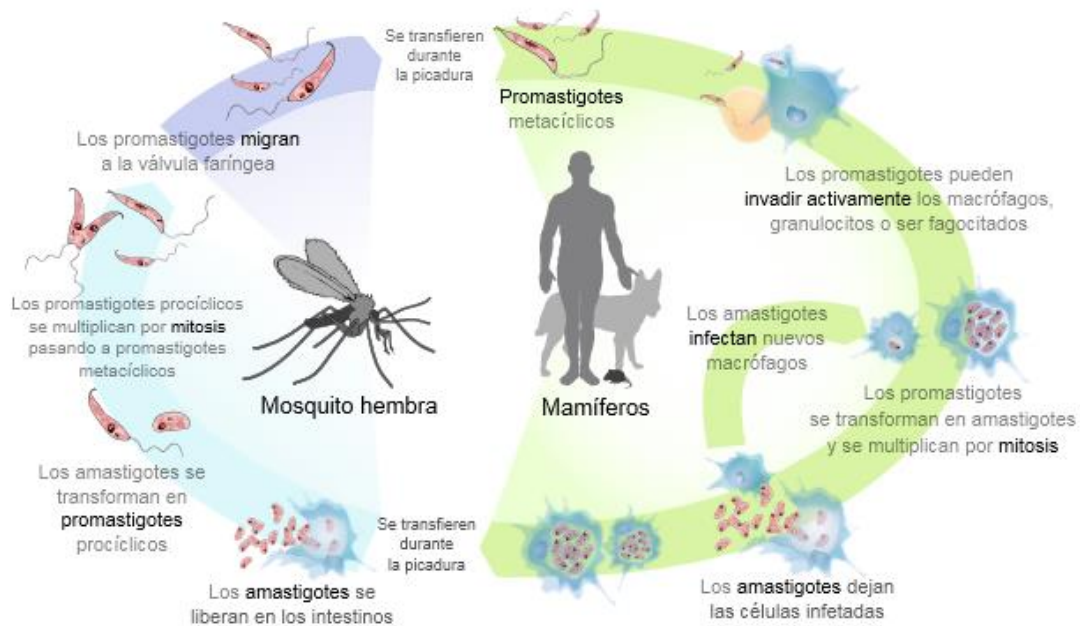


Figura 17.Ciclo vital de *Leishmania*

Fuente:https://Leishmaniasis#/media/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram-es.svg

6.2.4 Cuadro clínico

La enfermedad se presenta en tres formas principales:

- Leishmaniasis visceral (kala azar): es mortal si no se trata. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia.
- Leishmaniasis cutánea: es la forma más frecuente de Leishmaniasis y produce lesiones cutáneas en las zonas expuestas del cuerpo, son lesiones ulcerosas que pueden causar discapacidad grave, esta es la más frecuente en Latinoamérica y la conocida como Leishmaniasis esporotricóide.
- Leishmaniasis mucocutánea: conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta. El 90% de los casos mundiales de esta se dan en Brasil, Perú y Bolivia.(OPS, 2015)

6.2.5 Diagnóstico

El diagnóstico de Leishmaniasis se realiza mediante una combinación de un exámen clínico con un exámen parasitológico o serológico; sin embargo las pruebas serológicas están muy limitadas en la Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. El diagnóstico se confirma cuando las pruebas parasitológicas corroboran las manifestaciones clínicas.

El diagnóstico rápido se realiza mediante la aplicación de la intradermoreacción de Montenegro, sin embargo, este no se está utilizando en el momento debido a que no se encuentra en el mercado.

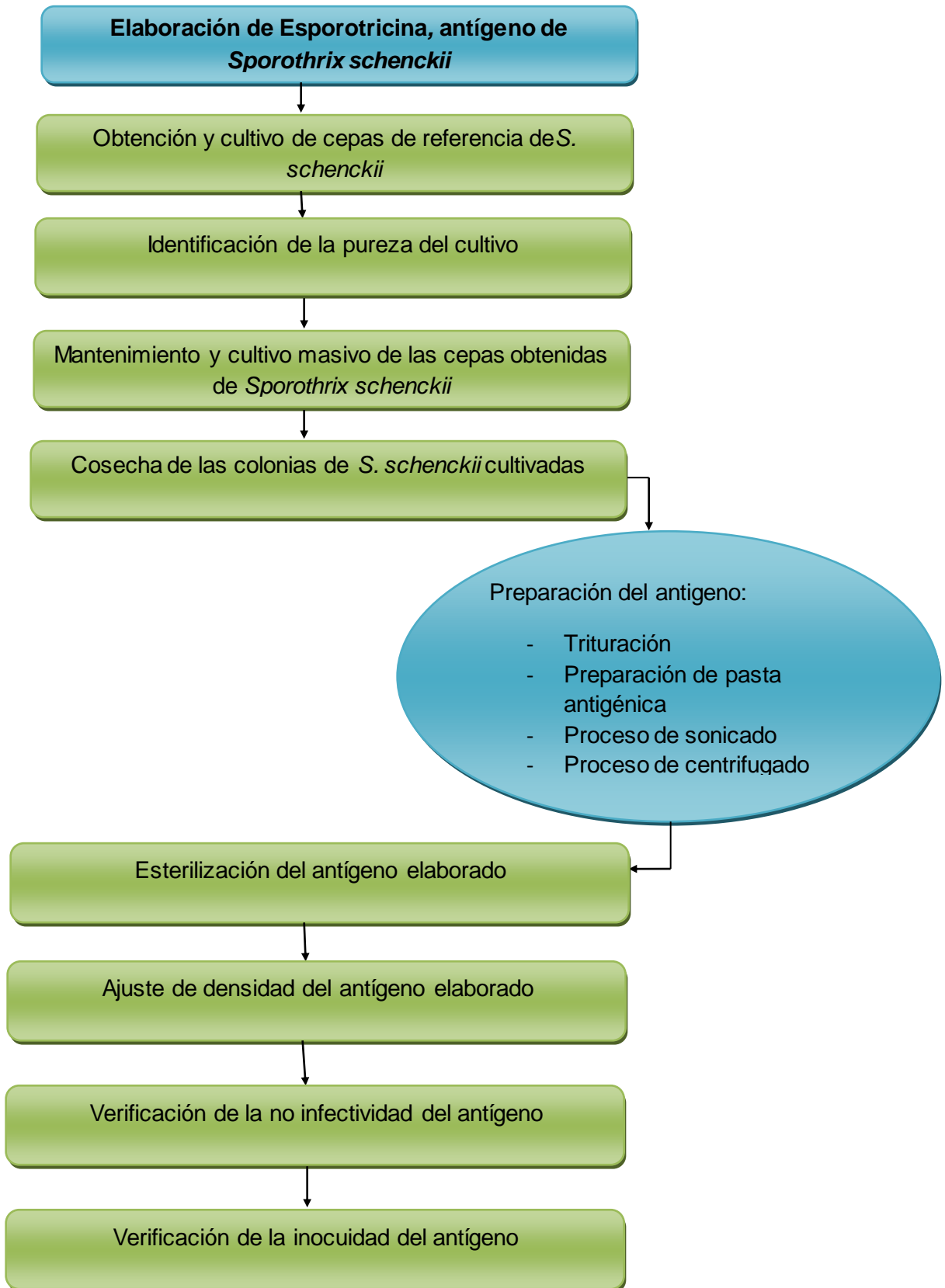
6.2.6 Tratamiento

El tratamiento depende del tipo de Leishmaniasis, especie de parásito y ubicación geográfica. Es tratable y puede curarse.(OMS, 2015)

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología seguida para la elaboración del antígeno Esporotricina fue la siguiente:

Protocolo de trabajo



7.1 Obtención de cepas de referencia.

Se obtuvo la cepa de referencia EH-143 de *Sporothrix schenckii* del Laboratorio de Micología del Hospital General de la ciudad de La Paz.

La cepa fue sembrada en una placa petri con agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol 0.5 ml/1000ml.

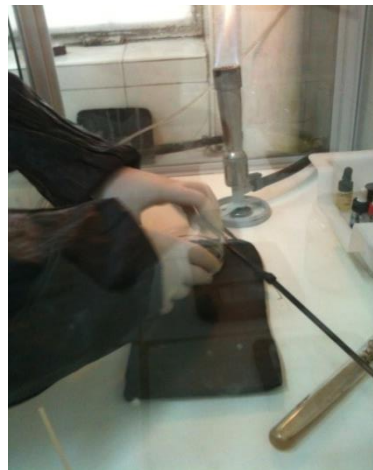
La siembra se realizó dentro de una campana de flujo continuo con una aguja bacteriológica y haciendo uso de un mechero Bunsen.



A.



B.



C.

Figura 18.A. Cepa de referencia obtenida del Hospital General. La Paz.
B y C. Sembrado de la cepa de referencia en caja petri con agar Sabouraud dextrosa + Cloranfenicol. Fuente: Elaboración propia.



Figura 19.Colonias de *S. schenckii* sembradas en agar Sabouraud dextrosa. Fuente: Elaboración propia

La cepa se incubó en estufa de cultivo microbiológico a 27°C durante 15 días.



Figura 20.Estufa de cultivo microbiológico donde se incuba el cultivo de *S. schenckii*. Fuente: Elaboración propia

7.2 Identificación de pureza del cultivo

Pasados los 15 días, se observó macroscópicamente el cultivo donde se evidenciaron las características específicas de un cultivo de *S. schenckii* según bibliografía (Hernandez, 2015): colonias de aspecto membranoso, con pliegues radiales de color blanco y color beige en algunos casos.



Figura 21. Cultivo obtenido a partir de la cepa de referencia, donde se observan las características morfológicas macroscópicas.

Fuente: Elaboración propia

Posteriormente se realizó un frotis del cultivo para la observación microscópica, para esto se tomó una colonia del cultivo usando una aguja bacteriológica, cerca de un mechero Bunsen para evitar la contaminación, se colocó en un portaobjetos, se realizó la tinción con azul algodón y se cubrió con un cubreobjetos.

Se observó al microscopio con objetivo 40x, y se pudieron observar las características microscópicas específicas de *S. schenckii* según bibliografía (Hernandez, 2015): hifas finas, ramificadas, hialinas, septadas, con conidióforos, dispuestas en forma de margarita.

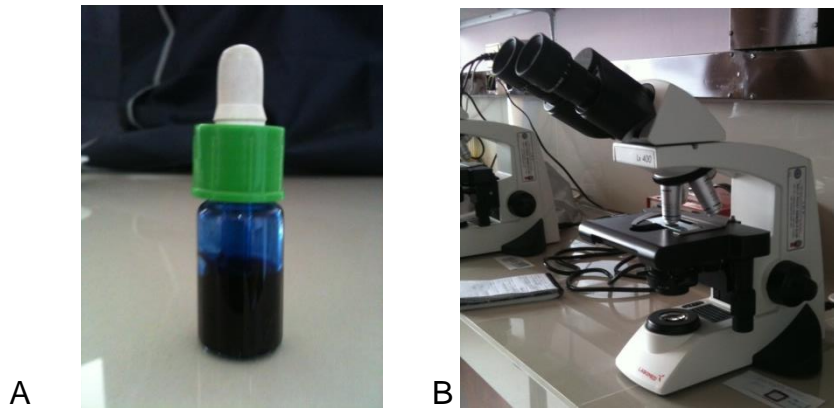


Figura 22.Material utilizado para la identificación de la pureza del cultivo.
A. Solución azul algodón. **B.** Microscopio. Fuente: Elaboración propia

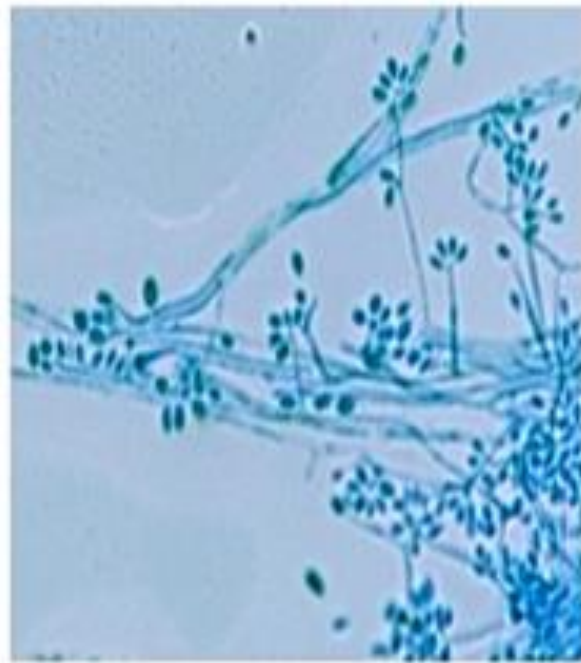


Figura 23.Observación microscópica de *S. schenckii* donde se confirma la pureza del cultivo. Fuente: Elaboración propia

Una vez comprobada la existencia única de *Sporothrix schenckii* según características macroscópicas y microscópicas del cultivo se puede identificar la

pureza del cultivo de *Sporothrix schenckii*; sin embargo para asegurar que se trata del hongo *S. schenckii*, se realizó la prueba de dimorfismo.

Prueba de dimorfismo:

En esta prueba se pretende evidenciar el cambio de fase micelial a fase levaduriforme.

Para esta prueba se realizó un cultivo en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), a partir del cultivo obtenido, el cual se encontraba en fase micelial, y se incubó en estufa de cultivo microbiológico a 37°C durante 3 días. Pasado este tiempo se observó la transformación de fase micelial a fase levaduriforme.

7.3 Mantenimiento y cultivo masivo de la cepa de *S. schenckii*

La cepa cultivada se mantuvo en estufa de cultivo microbiológico a 27°C; y al mismo tiempo se realizó el cultivo masivo, sembrando en varias placas petri con medio de cultivo Agar Sabouraud dextrosa con Cloranfenicol 0.5ml/1000ml siguiendo el mismo procedimiento anterior y realizando pruebas de pureza de cultivo en cada placa con total esterilidad del ambiente.



Figura 24. Sembrado de *S. schenckii* para cultivo masivo.

Fuente: Elaboración propia



Figura 25.Cultivo masivo de *S. schenckii*. Fuente: Elaboración propia

7.4 Cosecha de las colonias de *S. schenckii* cultivadas.

Se realizó la cosecha de las colonias de *Sporothrix schenckii* cultivadas. Se cosecharon todas las colonias de las cajas petri y tubos, un total de 11 cajas petri y 8 tubos tapa rosca, manteniendo en incubación la cepa inicial cultivada.

La cosecha se realizó en ambiente totalmente estéril, haciendo uso de guantes y barbijo; se cosechó cerca de un mechero Bunsen, utilizando una cucharilla estéril y una varilla de vidrio estéril; se sacaron las colonias enteras evitando sacar restos de medio de cultivo. Las colonias cosechadas se colocaron en una caja petri limpia, seca y estéril.



A.



B.



C.



D.



E

Figura 26.A. Material utilizado para la cosecha de colonias de *S. schenckii*. **B.** Esterilización del material durante el proceso de cosecha. **C. D.** Cosecha de colonias de *S. schenckii* **E.** Colonias cosechadas. Fuente: Elaboración propia.

7.5 Preparación de la pasta antigénica

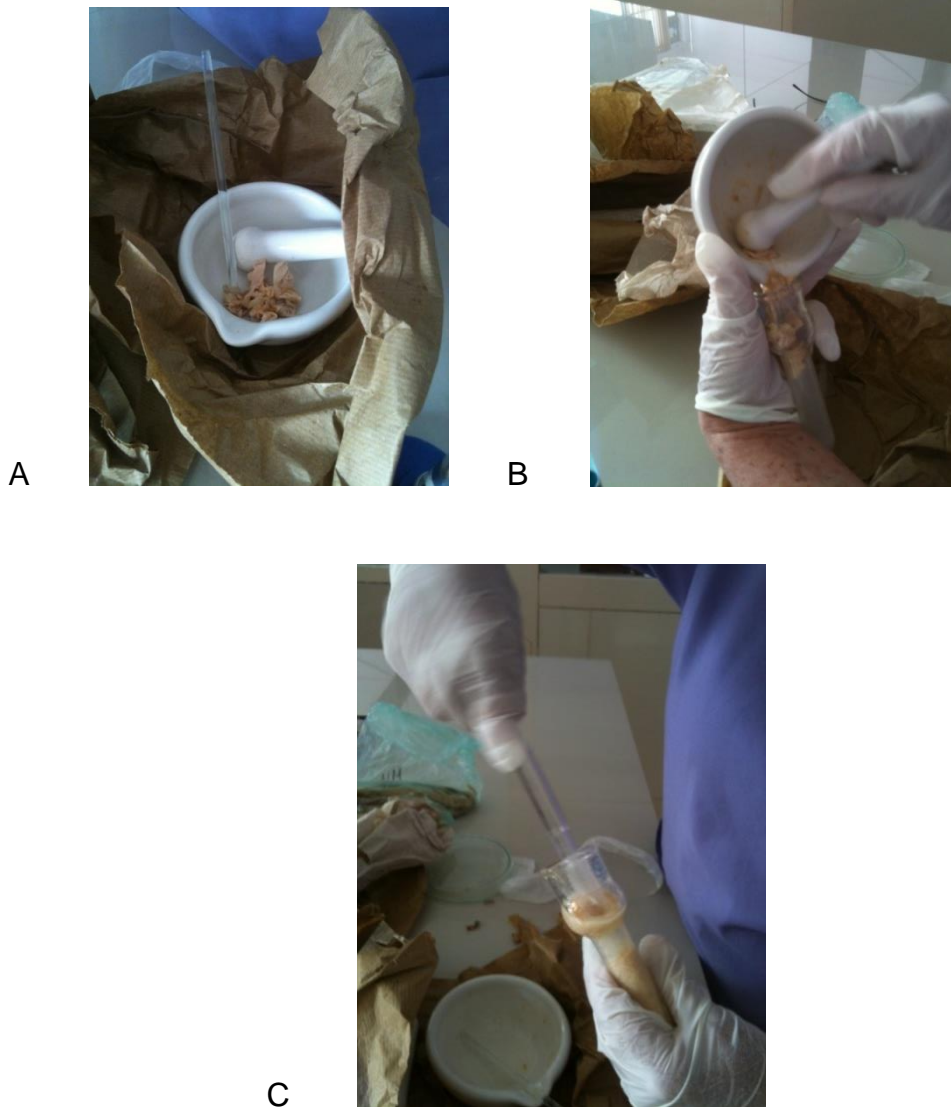
Para la preparación de la pasta antigénica se prepararon 500 ml de solución PBS (Phosphate Buffered Saline) 1x estéril. (ANEXO N° 2)



Figura 27.Material utilizado para la preparación de la solución PBS.

Fuente: Elaboración propia.

Se trituraron las colonias cosechadas en ambiente estéril utilizando un triturador de tejidos estéril y un mortero estéril, para facilitar la trituración y la formación de la pasta antigénica se utilizó la solución PBS preparada.





D

Figura 28.A. Triturado de colonias en mortero estéril. **B.C.** Triturado de colonias con PBS en triturador de tejidos. **D.** Pasta antigénica.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez preparada la pasta antigénica fue diluida con PBS estéril hasta obtener una solución antigénica con la densidad adecuada. Esta solución fue conservada en un frasco de vidrio estéril, y refrigerada hasta el momento de realizar el sonicado.



Figura 29.Pasta antigénica preparada. Fuente: Elaboración propia.

7.6 Proceso de sonicado.

El proceso de sonicado permite separar la pared celular del hongo, donde se encuentra el antígeno necesario para la elaboración de Esporotricina, del resto antigénico de la célula fúngica.

Para el proceso de sonicado se lavó cuidadosamente el desmembrador sónico y se preparó para sonicar la pasta antigénica.

Para esto se colocó en baño maría de agua destilada con hielo en el recipiente del desmembrador sónico y la pasta antigénica contenida en frascos estériles bien tapados y sujetos a un soporte mediante una pinza de Mohr.



Figura 30.Pasta antigénica en proceso de sonicado.

Fuente: Elaboración propia.

Se sometió a un proceso de sonicado a 300 decibeles, en 3 ciclos de 10 minutos cada uno con un descanso de 20 minutos entre cada ciclo.

7.7 Proceso de centrifugado.

Una vez sonicado se realizó la separación de las glicoproteínas de la pared celular del hongo, parte antigénica requerida en la elaboración de Esporotricina, de los restos de la célula fúngica; para esto se realizó un proceso de centrifugado.

Se centrifugó a 10000rpm durante 30 minutos; una vez centrifugado se recuperó el sobrenadante, que contiene el antígeno requerido, y se colocó en un frasco de vidrio estéril.



Figura 31. Pasta antigénica en proceso de centrifugado.

Fuente: Elaboración propia.

7.8 Esterilización del antígeno obtenido

Para esterilizar el antígeno obtenido se utilizó el método de Tindalización, ya que este tiene el poder de matar tanto microorganismos como sus esporas y no altera la estructura o composición del antígeno, constituido mayormente por polisacáridos.

El proceso de Tindalización es un método de esterilización por calentamiento discontinuo. Consiste en someter la solución mediante baño maría, a un proceso de elevación y disminución de temperatura, de tal manera que en cada etapa se elimine paulatinamente las formas vegetativas y esporas presentes.

El proceso se realiza, sometiendo la solución preparada a una temperatura de 80-100°C durante 30 minutos, en los cuales se destruye la totalidad de microorganismos existentes, sin embargo pueden quedar esporas, para esto se deja germinar las esporas que pudieran estar presentes, dejando la solución a temperatura de 37°C durante 24 horas, y pasadas las 24 horas se debe volver a

someter la solución a la temperatura de ebullición durante 30 minutos. Realizar este proceso en tres ciclos garantiza la esterilidad de la solución.

En nuestro caso, para el proceso de tindalización se colocó el frasco con el sobrenadante (antígeno obtenido) en baño maría a 80°C por 30 minutos; posteriormente se dejó a 37°C por 24 horas para dejar germinar esporas, volviendo a calentar a 80°C y se repitió el mismo proceso en 3 sesiones (3 días).

7.9 Ajuste de densidad del antígeno

Para ajustar la densidad del antígeno se utilizó el método turbidimétrico de Mc Farland.

Para esto se preparó la escala de Mc Farland utilizando Cloruro de Bario al 1% y Ácido sulfúrico al 1% en 10 tubos con diferente concentración en cada tubo (ANEXO 4)

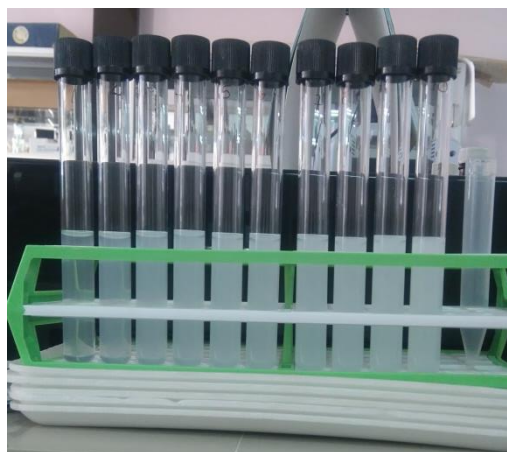


Figura 32.Escala de Mc. Farland. Fuente: Elaboración propia

Una vez preparada la escala se ajustó la densidad de la solución antigénica comparando con el tubo nº 5 de la escala de Mc Farland.

Estudios teóricos y experimentales han mostrado que soluciones diluidas de diferentes tipos de microorganismos, independientemente del tamaño celular, tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración de peso seco. Esto

quiere decir que, en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso seco, independientemente del tamaño celular del microorganismo. (Gamazo, 2005)

Una aplicación directa de la turbidimetría es la realización de una curva patrón en la que se relaciona la medida de absorbancia con el número de células del cultivo. De esta forma, a partir de la absorbancia de un cultivo podemos extrapolar de la curva patrón el número de microorganismos. (Gamazo, 2005)

Por lo tanto, para corroborar la densidad del patrón de turbidez, así como la densidad de la solución antigénica, para poder llegar a determinar la concentración aproximada del antígeno Esporotricina, se realizó la lectura de absorbancia de ambas soluciones: antígeno elaborado y tubo nº 5 de la escala, esto se realizó utilizando un espectrofotómetro en el rango de luz visible una longitud de onda de 625 nm.

A partir de la absorbancia obtenida en la lectura de todos los tubos de la Escala de Mc Farland, y del antígeno Esporotricina, se determinó la concentración aproximada de proteínas del antígeno elaborado, a través de una curva patrón utilizando la ley de Lambert y Beer, extrapolando a la curva obtenida de la escala, la lectura de absorbancia del antígeno Esporotricina; se tomó como referencia la concentración teórica de células por mililitro de la Escala de Mc Farland. (Gamazo, 2005)



Figura 33. Espectrofotómetro donde se realiza la lectura de absorbancia del antígeno y tubo nº 5 de la escala para el ajuste de densidad.

Fuente: Elaboración propia

7.10 Verificación de no infectividad del antígeno

Para verificar la no infectividad, es decir, la esterilidad del antígeno elaborado, se realizaron cultivos en medios enriquecidos: Agar Sangre, Agar BHI, Agar nutritivo y Agar Sabouraud dextrosa. Para esto se prepararon adecuadamente los medios de cultivo, en total esterilidad (ANEXO 1). Esto se realizó en el instituto SELADIS utilizando los ambientes estériles de los laboratorios de Microbiología y de Genética.



Figura 34.Medios de cultivo y campana de flujo continuo, estériles para la siembra del antígeno. Fuente: Elaboración propia



Figura 35.Medios de cultivo: agar Sangre y agar Nutritivo, antes de la siembra del antígeno elaborado. Fuente: Elaboración propia

Una vez preparados y esterilizados los medios de cultivo se sembró el antígeno Esporotricina con un hisopo estéril en toda la superficie de la placa de agar, este proceso se realizó dentro de una campana de flujo continuo. Las placas sembradas se incubaron en estufa de cultivo microbiológico a 28°C durante 24 horas; las placas de agar Sabouraud se incubaron durante 15 días, ya que este es un medio selectivo para hongos, y este es el tiempo necesario de incubación para descartar en su totalidad la existencia de restos fúngicos patológicos que pudieran estar presentes en la solución antigénica.

7.11 Verificación de la inocuidad del antígeno

La inocuidad es la garantía de que el producto elaborado no causará daño al consumidor, en este caso al paciente, cuando este sea inoculado. La inocuidad asegura la calidad de la producción y elaboración del producto (OPS/OMS, 2002).

En cuanto a la verificación de la inocuidad del antígeno elaborado se realizó por inoculación del antígeno en ratones.

Para esto se utilizaron 6 ratones swiss albinos, machos, de 22 g de peso cada uno. A cada ratón se le inoculó por vía intradérmica abdominal 0.1 ml del antígeno Esporotricina elaborado; el antígeno estaba disuelto en PBS y con una concentración de 15µg proteínas/ml

Los ratones se dejaron en observación con las características de ambientes y alimentación necesarias (ANEXO 4) durante 20 días.



Figura 36.Inoculación del antígeno Esporotricina en los animales de experimentación.Fuente: Elaboración propia



Figura 37.Animales de experimentación inoculados con Esporotricina en observación. Fuente: Elaboración propia

Se fue observando el comportamiento y estado de salud de los animales cada dos días; los parámetros evaluados fueron: comportamiento, estrés, presencia de lesiones en el lugar de la inoculación y otros lugares, y fiebre.

Una vez terminada la evaluación después de 22 días se practicó eutanasia física por dislocación cervical.

8. RESULTADOS

El presente trabajo está dirigido a la elaboración de un antígeno, proveniente de células fúngicas de *Sporothrix schenckii*, que pueda, mediante una reacción intradérmica, dar un diagnóstico rápido y específico en pacientes con esporotricosis, además de brindar un método rápido para diagnóstico diferencial de Leishmaniasis esporotricóide.

Los resultados fueron obtenidos a partir de la metodología indicada en el diagrama de protocolo de trabajo.

8.1 Identificación de la pureza del cultivo.

En el cultivo obtenido a partir de la cepa de referencia se observó la morfología característica tanto macroscópica como microscópica de *Sporothrix schenckii*. Además, no se observó otra forma fúngica o de cualquier otro microorganismo que no corresponda a *Sporothrix schenckii*.



Figura 38. Observación macroscópica de *S. schenckii*. Colonias características membranosas, bordes radiales y blancas.

Fuente: Elaboración propia

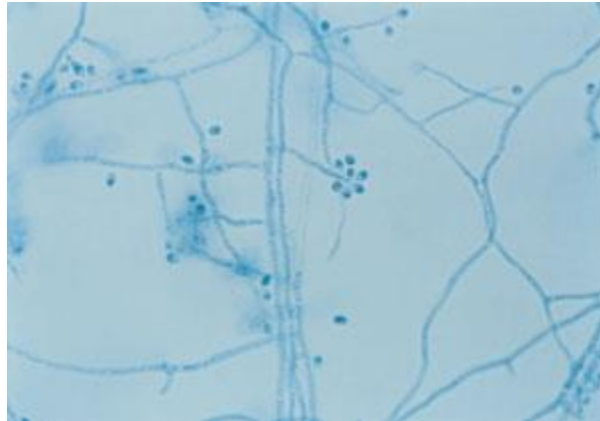


Figura 39. Observación microscópica de *S. schenckii*. Hifas finas, ramificadas con conidióforos en forma de margarita. Fuente: Elaboración propia.

Prueba de dimorfismo:

Al realizar la prueba de dimorfismo se pudo confirmar la pureza del cultivo obtenido, ya que se observó el cambio de fase micelial a fase levaduriforme al incubar el hongo a una temperatura de 37°C.

El cambio de fase se confirmó por observación macroscópica y microscópica del cultivo.

Observación macroscópica:

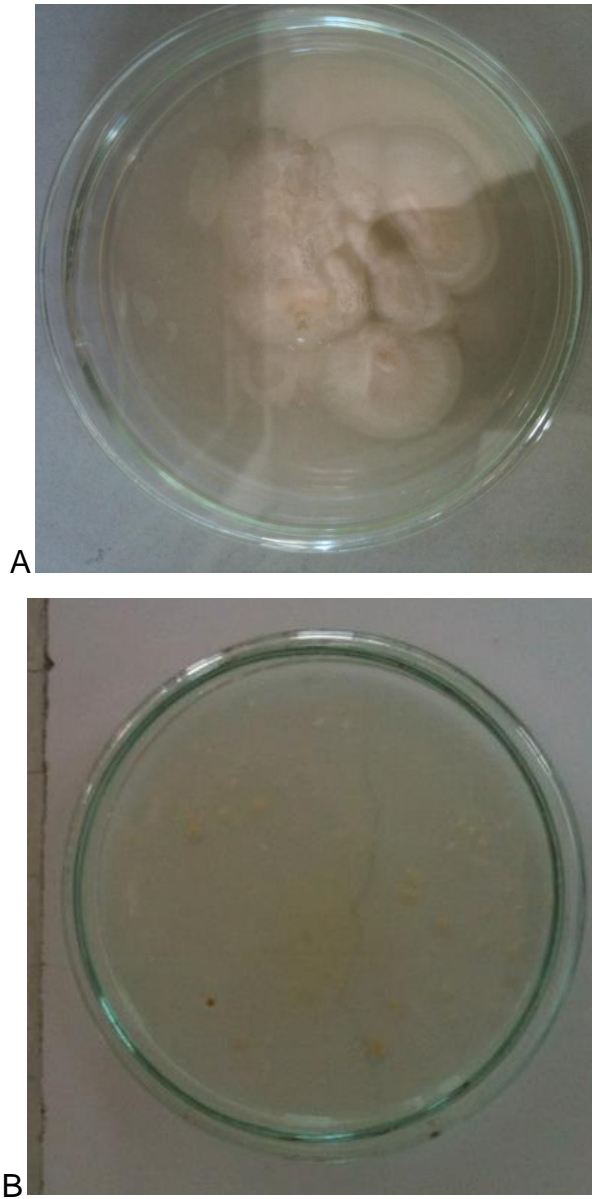


Figura 40. Observación macroscópica del cambio de fase. **A.** Fase micelial.
B. Fase levaduriforme. Fuente: Elaboración propia

Se pudieron observar, en fase micelial las características típicas mencionadas anteriormente, y en la fase levaduriforme, las características típicas: colonias cremosas blanco amarillentas, similares a colonias bacterianas.

Observación microscópica:

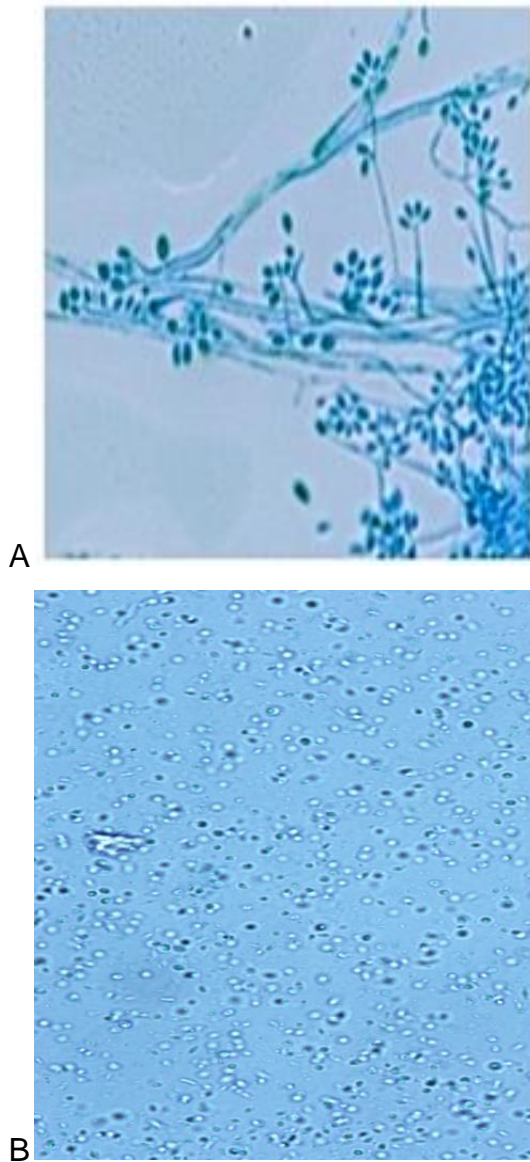


Figura 41. Observación microscópica del cambio de fase. **A.** Fase micelial. **B.** Fase levaduriforme. Fuente: Elaboración propia.

Se pudieron observar, en fase micelial las características típicas mencionadas anteriormente, y en la fase levaduriforme, las características típicas: levaduras de forma variable, redondas, ovoides, con gemación.

Una vez concluidas las observaciones macroscópicas y microscópicas de la fase micelial que indican la existencia real y única del hongo *S. schenckii* y realizada la prueba de dimorfismo que corrobora la identidad del hongo (Hernandez, 2015); se puede confirmar la pureza del cultivo de *Sporothrix schenckii*.

8.2 Proceso de sonicado y centrifugado.

La sonicación es un proceso con numerosos efectos tanto físicos como químicos; el efecto consiste en un fenómeno de cavitación acústica basada en la formación, incremento y colapso por implosión de burbujas en un líquido. Estas cavitaciones llegan a desestabilizar la pared celular de la célula. (Suslick., 1989)

De esta manera, a través del proceso de sonicado, se produjo la desmembración de la célula fúngica.

Una vez desmembrada la célula se realizó la separación de la parte antigénica requerida para la elaboración del antígeno Esporotricina (glicoproteínas de la pared celular) del resto antigénico de la célula por medio del centrifugado, en el cual se obtuvo un sobrenadante que contiene la parte antigénica glucoproteica, y el precipitado donde se encuentra el resto antigénico de la célula, el precipitado fue desechado.

8.3 Esterilización del antígeno obtenido.

El método elegido para la esterilización fue la Tindalización, ya que este método es el indicado para esterilizar sustancias que no pueden calentarse por encima de 100°C, en este caso, un calentamiento excesivo podría afectar las glicoproteínas que componen el antígeno. Este método permite, por el calentamiento al que se somete el producto elaborado, eliminar bacterias que pudieran estar presentes conservando la actividad del antígeno; además, se utiliza un tiempo de incubación entre cada ciclo de calentamiento donde se permite la germinación de esporas, esto resulta muy útil en este caso debido a las esporas fúngicas que pudieran

estar presentes; siendo estas destruidas en la siguiente fase de calentamiento. (Pérez, 2010)

Mediante el proceso de Tindalización se obtuvo un antígeno Esporotricina sin presencia de ningún microorganismo.

Además este proceso permite corroborar que se trata de la porción glucoproteica de la pared celular, ya que mediante el calentamiento, los azúcares, que componen la mayor parte del antígeno Esporotricina, no precipitan, las proteínas precipitan en procesos de calentamiento, por lo tanto, los antígenos compuestos por mayoría de parte proteica precipitan; al no encontrar precipitado en el producto tindalizado se confirma la presencia de la parte glucoproteica y no así presencia de otras partes antigénicas de la pared celular o del resto de la célula fúngica.

8.4 Ajuste de densidad del antígeno.

Para ajustar la densidad del antígeno Esporotricina elaborado se utilizó el método turbidimétrico de la Escala de Mc Farland.

Se comparó el antígeno Esporotricina elaborado con el patrón de turbidez, para lo que se utilizó el tubo nº 5 de la Escala de Mc Farland, encontrando una perfecta similitud en la densidad de ambos tubos.

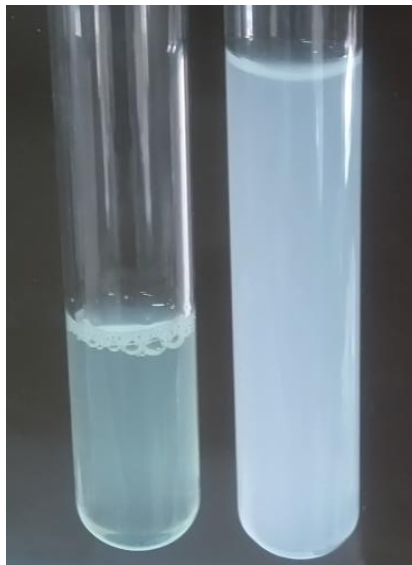


Figura 42. Comparación de densidad del antígeno preparado con el tubo nº 5 de la escala de Mc. Farland. Fuente: Elaboración propia.

Para corroborar el resultado observado y determinar concentración aproximada del antígeno Esporotricina, se realizó la lectura de absorbancia de los 10 tubos de la Escala de Mc Farland y la absorbancia del tubo que contiene la muestra del antígeno Esporotricina elaborado a 625 nm.

Los resultados fueron los siguientes:

Nº tubo Escala Mc Farland	Absorbancia
1	0.253
2	0.300
3	0.453
4	0.602
5	0.806
6	0.935
7	1.042
8	1.103
9	1.293
10	1.305

Tabla 2.Tabla de absorbancias obtenidas de la escala de Mc Farland.

Fuente: Elaboración propia.

- ❖ La absorbancia obtenida de la muestra de Antígeno Esporotricina fue de **0.805**

Realizando una curva patrón según la ley de Lambert y Beer, utilizando la absorbancia obtenida y la concentración celular en $\mu\text{g/ml}$ según la bibliografía (Gamazo, 2005) y extrapolando con la absorbancia obtenida de la muestra del antígeno Esporotricina, los resultados fueron los siguientes:

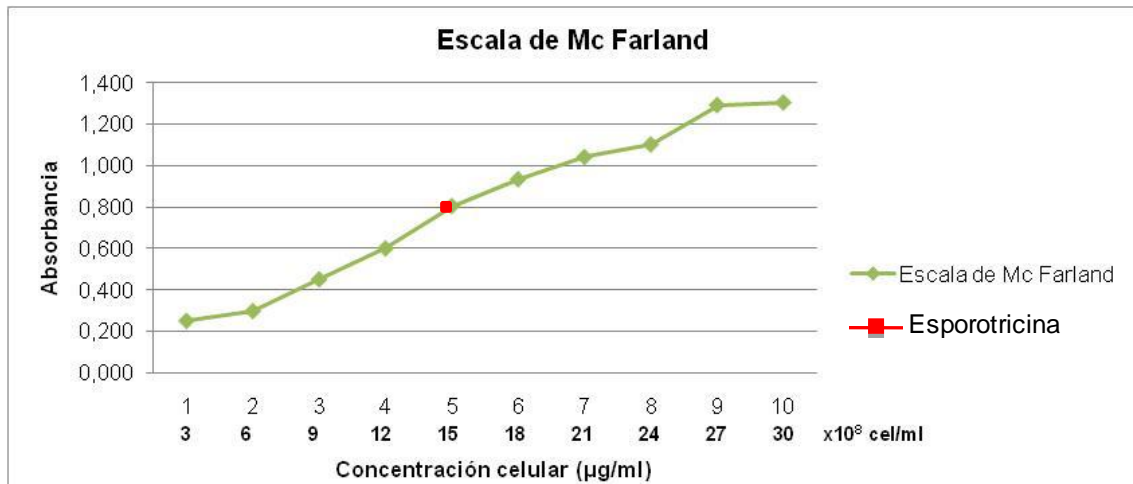


Figura 43. Curva de determinación de proteínas. Se observa la curva obtenida con las absorbancias de la Escala de Mc Farland y el punto de extrapolación de la absorbancia obtenida del antígeno Esporotricina. Fuente: Elaboración propia.

- ❖ A partir de esta curva se puede determinar una concentración aproximada del antígeno Esporotricina elaborado de **15x10⁸ µg/ml**

8.5 Verificación de la no infectividad del antígeno.

Para la verificación de la no infectividad del antígeno se realizaron cultivos en medios enriquecidos, con la temperatura y tiempo necesarios para el crecimiento tanto de bacterias como de hongos que pudieran estar presentes.

Los resultados fueron:

- ❖ Agar sangre-incubación 24 hrs a 37°C: **no crecimiento**
- ❖ Agar BHI-incubación 24 hrs a 37°C: **no crecimiento**
- ❖ Agar nutritivo-incubación 24 hrs a 37°C: **no crecimiento**
- ❖ Agar Sabouraud-incubación a 27°C y a 37°C por 15 días: **no crecimiento**

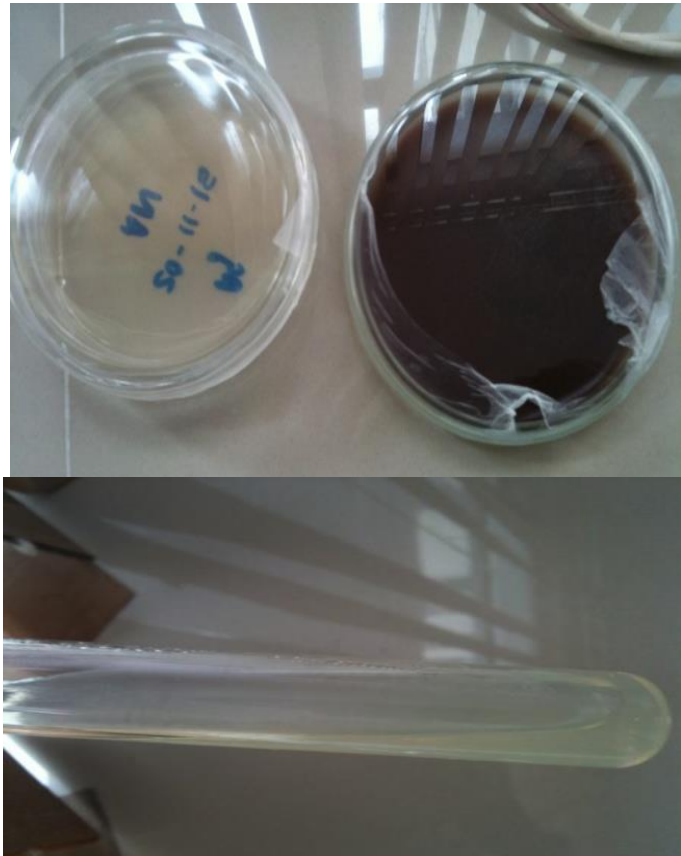


Figura 44.Medios de cultivo: agar Sangre, agar Nutritivo y agar Sabouraud incubados, donde no se observó crecimiento. Fuente: Elaboración propia

8.6 Verificación de la inocuidad del antígeno esporotricina.

Para verificar la inocuidad del antígeno Esporotricina se trabajó con animales de experimentación, a los cuales se inoculó por vía intradérmica el antígeno Esporotricina elaborado.

Los resultados fueron los siguientes:

Actividad	Días de observación							
	1 (30/11)	2 (02/12)	3 (04/12)	4 (07/12)	5 (09/12)	6 (11/12)	7 (14/12)	8 (16/12)
Actividad General	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Fiebre	No	No	No	No	No	No	No	No
Presencia de lesiones	No	No	No	No	No	No	No	No

Tabla 3.Tabla de comportamiento de los ratones inoculados con el antígeno. Fuente: Elaboración propia

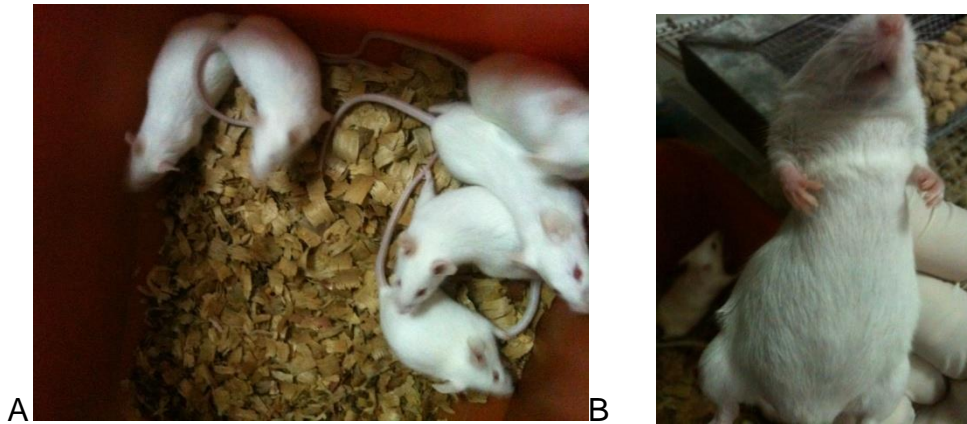


Figura 45.Observación de animales de experiemntación inoculados con Sporotrichina. **A.**Observación del comportamiento y estrés de los animales. Primeros días. **B.** Observación de alteraciones, lesiones y fiebre en los animales. Primeros días. Fuente: Elaboración propia.

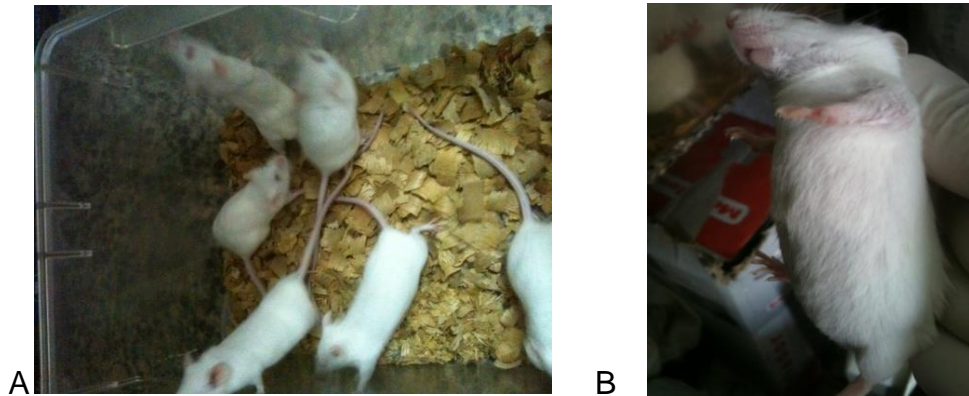


Figura 46. Observación de animales de experimentación inoculados con Sporotrichina. **A.** Observación del comportamiento y estrés de los animales. Último día. **B.** Observación de alteraciones, lesiones y fiebre en los animales. Último día. Fuente: Elaboración propia

Durante los 20 días de prueba, en los animales de experimentación se observaron los parámetros indicados cada dos días, en los cuales, como se muestra en la tabla 3 y en las figuras 45A y 46A, no hubo ningún cambio en el comportamiento ni condición física o fisiológica de los animales de experimentación. No presentaron estrés, fiebre o alguna manifestación esporotricoides (Figuras 45B y 46B).

Con estos datos se puede evidenciar la inocuidad del antígeno Sporotrichina elaborado.

Una vez verificado el estado óptimo del producto es completamente seguro para realizar pruebas diagnósticas en pacientes con esporotricosis y diagnóstico diferencial a pacientes con Leishmaniasis esporotricoides.

9. DISCUSIÓN

En el diagnóstico de laboratorio, si bien dentro de la bibliografía existen otro tipo de pruebas para Sporotricosis, además de las citadas, las publicaciones son escasas y diversas, por ejemplo: en 1974, Camargo describe un método de inmunofluorescencia directa utilizando un suero anti esporotricosis marcado con fluorocromo; de igual manera, Kaplan e Ivens en 1960 revelaban las lesiones de

esporotricosis con globulina anti *S. schenckii* preparada en conejos y marcada con fluorescencia(Silva, 1984). Otros procesos serológicos que fueron descritos fueron la aglutinación de Widal y Abrami que obtuvieron reacciones positivas durante el periodo de infección, que bajaron después de la cura. En estos procesos el problema es que el suero de pacientes con Esporotricosis es capaz de aglutinar con otros antígenos micóticos(Silva, 1984)

Ninguna de estas técnicas ha sido estandarizada y patronizada para su utilización en kits comerciales de utilidad en el diagnóstico de Esporotricosis cutánea tipo gomoso.

En algunos países es utilizada la inmunofluorescencia indirecta con excelentes resultados, sin embargo el costo es muy alto, y tomando en cuenta, que la mayoría de los pacientes con esporotricosis proviene de poblaciones alejadas y son de bajos recursos, no es un procedimiento accesible.

El uso de esta intradermorreacción no está aceptado en la mayoría de los países europeos ni en Estados Unidos debido a que consideran que su producción no está estandarizada y que, en algunos casos se utiliza fragmentos del hongo.(Bonifaz, 2013); sin embargo, como se puede evidenciar, el método utilizado para la realización de este antígeno para intradermorreacción es totalmente seguro para el paciente ya que se cuenta con un procedimiento específico de esterilización en el que se asegura la eliminación tanto de bacterias como de hongos que pudieran estar presentes; además, se cuenta también con pruebas tanto de no infectividad como de inocuidad que le dan garantía al producto.

Según estudios de países endémicos como México, la intradermorreacción es una herramienta fundamental para realizar el diagnóstico rápido y específico de esporotricosis, además para conocer el estado inmunológico del paciente.(Bonifaz, 2013)

En otros artículos estudiados se indica la preparación de antígeno Esporotricina como suspensión de levaduras muertas, indicado para el diagnóstico de Esporotricosis(Negróni, cohorte 2012-2013) y es eficiente al igual que el antígeno metabólico, sin embargo este antígeno elaborado a partir de levaduras muertas no

da un resultado diagnóstico actual, ya que la intradermorreacción que induce es positiva durante muchos años, incluso si el paciente solo tuvo contacto con el hongo sin adquirir la enfermedad. Sin embargo, el antígeno metabólico, producido a partir de fragmentos fúngicos, como es la pared celular, pasa a ser negativo de uno a tres años de la curación de la enfermedad.(Rodriguez, 2008)

Por otro lado, también existen artículos donde se utiliza el antígeno micelial metabólico para estudios de epidemiología, lo cual es totalmente válido, sin embargo, no es lo más aconsejable por lo que se explicó anteriormente.(Bonifaz, 2013)

Otro tema de discusión respecto a la elaboración del antígeno Esporotricina, puede ser el método de determinación de proteínas, ya que en algunos casos se exigen métodos convencionales como el método de cuantificación de proteínas de Lowry. La determinación de proteínas del antígeno Esporotricina es este caso, se realizó por método turbidimétrico, debido a que después de haber hecho un análisis de las diferentes modalidades de determinación de proteínas para antígenos se llegó a la conclusión de que siendo el mayor componente del antígeno Esporotricina glucopéptidos, y en mayor cantidad polisacáridos, una determinación de proteínas solo conduce a la determinación de una pequeña fracción del total antigénico, ya que estos métodos se basan en la detección de aminoácidos y no toman en cuenta la alta concentración de azúcares (Fernandez, 1990).Además estos métodos tienen rangos de sensibilidad muy bajos, no detectan pequeñas cantidades de proteínas, sino rangos mayores a los presentes en nuestro antígeno. Según la experiencia de trabajadores del instituto INLASA, quienes fueron las únicas personas que elaboraron en el pasado el antígeno Esporotricina en Bolivia, la mejor forma para determinar una concentración aproximada del antígeno, es por método turbidimétrico utilizando como patrón el tubo nº 5 de la Escala de Mc Farland.

El antígeno Esporotricina elaborado en este proyecto, es completamente útil tanto para ser utilizado tanto con fines epidemiológicos como diagnóstico, sin embargo, su utilidad más acertada es el diagnóstico de Esporotricosis así como el uso como instrumento de diagnóstico diferencial para Leishmaniasis esporotricoides.

También existen artículos donde explican la utilidad del antígeno Esporotricina para estandarización de técnicas de diagnóstico de Esporotricosis como Inmunodifusión, test de ELISA y contraelectroforesis; en estos casos utilizan el antígeno Esporotricina como patrón enfrentándolo a sueros de pacientes con Esporotricosis. También en estos casos es útil el antígeno Esporotricina elaborado en este proyecto.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

10.1 Conclusiones.

- ❖ Se obtuvo el antígeno Esporotricina para el diagnóstico rápido y específico de infecciones causadas por *Sporothrix schenckii*, así como para realizar el diagnóstico diferencial en casos de Leishmaniasis.
- ❖ Se gestionó la dotación de la cepa de referencia proveniente del Laboratorio de Micología del Hospital General de la ciudad de La Paz, a partir de la cual obtuvimos el primer cultivo, accediendo así al material biológico requerido para la elaboración del antígeno Esporotricina.
- ❖ Una vez obtenido el primer cultivo, se realizaron a partir de este, varios cultivos con el fin de cultivar masivamente el hongo.
- ❖ Después de obtener el cultivo en la cantidad suficiente, se elaboró el antígeno Esporotricina siguiendo el protocolo que se especifica en el diagrama nº 1, utilizando la parte glucoproteica de la pared celular del hongo *Sporothrix schenckii* cultivado.
- ❖ Elaborado el antígeno Esporotricina se realizó el ajuste de densidad por método turbidimétrico utilizando la Escala de Mc Farland, el cual nos llevó a la determinación de la concentración aproximada de $15 \times 10^8 \mu\text{g}$ proteínas/ml.
- ❖ Una vez determinada la concentración, se tiene el antígeno listo para su utilización. Además, para asegurar la inocuidad y no infectividad del producto se realizaron pruebas por medio de cultivos en medios enriquecidos y por inoculación del antígeno Esporotricina en animales de experimentación; en

ambos casos se obtuvieron resultados óptimos que aseguran la inocuidad y esterilidad del producto.

- ❖ Para validar totalmente la eficacia del producto, en un próximo proyecto, se sugiere realizar las pruebas de intradermoreacción en un grupo de pacientes con Esporotricosis y las pruebas de diagnóstico diferencial en pacientes con Leishmaniasis esporotricoides.

10.2 Recomendaciones.

- ❖ Se recomienda tener los mayores cuidados y medidas de bioseguridad a la hora de la elaboración de los medios de cultivo, así como en el sembrado de las colonias y a la hora de realizar los frotis y pruebas de pureza; esto con el fin de evitar una contaminación bacteriana o fúngica que pueda infectar el producto.

- ❖ Se recomienda una buena elaboración de los medios de cultivo, utilizar medios de cultivo en buen estado, disolver de la forma adecuada, autoclavar, y tener los mayores cuidados a la hora de plaquear el medio en los recipientes para evitar cualquier tipo de contaminación.

Se recomienda utilizar una campana de flujo continuo totalmente estéril, irradiada con luz Ultravioleta durante 15 minutos, para asegurar la esterilidad del procedimiento.

- ❖ Al igual que en el proceso de sembrado, en la etapa de elaboración del antígeno, se recomienda utilizar todas las medidas de bioseguridad en la esterilización de material y sobre todo en los procesos de trituración, sonicación, y centrifugación.

Se recomienda lavar y desinfectar bien el recipiente de baño maría donde se va a realizar el proceso de Tindalización, ya que este proceso es muy importante y marca la garantía del producto elaborado.

- ❖ En la etapa de ajuste de densidad del antígeno, se recomienda, elaborar la Escala de Mc Farland exclusivamente para este trabajo, con el fin de evitar que pueda tener algún tipo de partículas que puedan alterar la turbidez de la escala y por lo tanto alterar el resultado de ajuste de densidad del antígeno elaborado.

Además se recomienda limpiar minuciosamente las cubetas utilizadas en el espectrofotómetro con el fin de no alterar los resultados de absorvancia.

- ❖ Para las pruebas de no infectividad, se recomienda, al igual que en los cultivos iniciales, tener los mayores cuidados en la elaboración de medios de cultivo, en el manejo de estos, y principalmente en este caso, en la siembra de la muestra, ya que este es un punto crucial que determina los principales resultados del proyecto.

- ❖ Se debe utilizar una campana de flujo continuo irradiada por 15 minutos con luz Ultravioleta, se deben utilizar todas las medidas de bioseguridad pertinentes y esterilizar debidamente el material.

- ❖ Respecto al trabajo con animales de experimentación, se debe tener el mayor cuidado, no exponerlos a ninguna situación de estrés y seguir el protocolo de ética para el trabajo con animales de experimentación. (ANEXO N°5)

11. BIBLIOGRAFÍA.

- Amado, S. (2011). Clasificación de la esporotricosis. Una propuesta con base en el comportamiento inmunológico. *Dermatología Revista Mexicana* , 200-208.
- Aranzazu, N. (2007). Esporotricosis cutánea en un lactante mayor. *PIEL Latinoamericana* .
- Arenas, R. (2004). *Micología Médica Ilustrada*. Ed. Mc Graw Hill.
- Ayats Ardite, J. (2005). *Sporothrix schenckii*. Barcelona: Servicio de microbiología Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat.
- Bastos de Lima, B. (2011). *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews* , 244-633.
- Bonifaz, A. (2013). Prueba intradérmica con esporotricina en una comunidad de la Sierra Norte de Puebla. *Dermatol Rev Mex* , 428-432.
- Carlos Alba-fierro, A. P.-T.-R.-C.-B. (2013). Cell wall preteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents. *Revista Iberoamericana de Micología* , 86-89.
- Carrada, T. (2012). Esporotricosis: avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica* , 147-171.
- Espinoza, D. E. (2015). *Hospital General*.
- Farland, J. (1907). The nephelometer. *J.Am.Med.Assoc* , 1176-1178.
- Fernandez, E. (1990). *Metodos para la cuantificación de proteínas*. Córdoba: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales.
- Gamazo, C. (2005). *Manual práctico de Microbiología*. España.
- H. VELEZ, L. S. (1984). *ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ANTIGENOS MICELIAR Y LEVADURA DE S. SCHENCKII MEDIANTE PRUEBAS CUTANEAS*. MEDELLIN.
- H., R. (1968). prueba cutánea con esporotricina. Su sensibilidad y especificidad. *Mycopath Mycol Appl* , 42-54.
- Hernandez, F. (2015). Esporotricosis. *Unidad de Micología, Micología médica Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. UNAM* .
- Hogan HL, B. S. (1996). Virulence factors of Medically Important Fungi. *Clin Microbiol Rev* , 469-488.

<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2015/05/sporothrix-schenckii-complex-revisited.html>.
(s.f.).

Negrón, R. (cohorte 2012-2013). *Preparación de antígenos para reacciones serológicas y pruebas cutáneas. Técnicas de ejecución de pruebas serológicas. Interpretación de resultados*. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina.

OMS. (2015). *Leishmaniasis*. Nota descriptiva N° 375.

OPS. (2015). *Leishmaniasis*. nota descriptiva N° 375.

OPS/OMS. (2002). Inocuidad de los alimentos, calidad para el consumo. *Mundialb* .

Pérez, B. (2010). Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. *Reduca. Serie Microbiología* , 1-14.

Rodríguez, M. (2008). Intradermoreacciones en dermatología. *Dermatología Rev Mex* , 160-174.

Romero, E. L., Reyes-Montes, M., Torres, A. P., & R.-B. E.-C.-M.-C. (2011). . Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol* , 85-102.

Rubio, G. (2010). Esporotricosis: Prevalencia, perfil clínico y epidemiología en un centro de referencia. *Bogotá: Revista Iberoamericana de Micología* .

Saldaña, L. S. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología peruana* , 82-98.

Sanchez, L. (2009). Infecciones micóticas subcutáneas. *Dermatología peruana* , 363.

SCHNEIDAUF, L. L. (1964). Cutaneous hypersensitivity to sporotrichin in Louisiana. *JAMA* , 371-373.

scribd.com/doc/55693777/esporeticosis, h.

Stoichevich, F. (2014). ESPOROTRICOSIS. Revisión bibliográfica. *Universidad Nacional de la Plata. Especialización en Dermatología* , 4.

Suslick., K. S. (1989). The chemical effects of ultrasound. *Scientific American* , 80-87.

Szanişzlo, P. (1985). *Fungal Dimorphism with Emphasis on fungus Pathogenic of Humans*. USA: Plenum press.

Trujillo, M. R. (2013). Esporotricosis granulomatosa: presentación de dos casos inusuales. *Revista chilena de infectología* .

University, C. o. (2010). Leishmaniasis (cutánea y visceral). *the center for Food Security and Public Health* , 1-13.

Zapana, V. (2015). *Cada año suben en un 20% los casos de Leishmaniasis*. La Paz: Periódico Página siete.

ANEXOS

ANEXO 1

TABLA DE RECURSOS UTILIZADOS

MATERIALES	REACTIVOS	EQUIPOS
Tubos de cultivo con tapa rosca	Medios de cultivo: Sabouraud, agar sangre, agar nutritivo	Autoclave
Cajas Petri	Azul algodón	Refrigerador
Viales	PBS 1x	Balanza
Gradillas	Agua destilada	Hornilla
Soportes y Pinzas	Cloranfenicol 0,05 g/L	Ph metro
Algodón	Hielo	Microscopio
Matraz Erlenmeyer 250 ml, 500 ml		Homogeneizador
Gasa estéril		Cronómetro
Pita		Baño maría
Asa bacteriológica	OTROS RECURSOS	Campana de flujo continuo
Aguja bacteriológica	Animales de laboratorio: 6 ratones suiss albinos machos en t° ambiente de 25° C	Mechero Bunsen
Agitador magnético		Termómetro
Mortero		Estufa de cultivo microbiológico
Triturador de tejidos		Desmembrador sónico
Espátula		
Frascos de vidrio		
Parafilm		
5 jeringas de 1 ml con aguja		
Hisopo estéril		
Varillas de vidrio		
Propipeta		
Probeta 50ml		
Pizeta		

Tabla 4.Tabla de materiales y recursos utilizados.

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 2

ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

1. AGAR SABOURAUD.

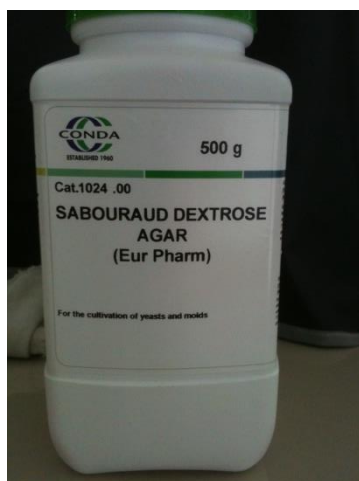
Composición:

	Concentración del medio
Peptona	10.0 g/L
D-glucosa	40.0 g/L
Agar	12.0 g/L
pH final: 5.3±0.2	

Tabla 5. Composición de Agar Sabouraud dextrosa. Fuente: Mast Group Ltd

Preparación:

- ❖ Suspender 65g del medio deshidratado en 1 L de agua destilada
- ❖ Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver totalmente los ingredientes.
- ❖ Añadir 0.05 g/L de cloranfenicol
- ❖ Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- ❖ Distribuir y enfriar a temperatura ambiente



A



B

Figura 47. A. Agar Sabouraud deshidratado. B. Preparación de agar Sabouraud. Fuente: Elaboración propia

2. AGAR BHI (INFUSIÓN CEREBRO CORAZON).

Composición:

	Concentración del medio
Infusión de cerebro y corazón(sólidos)	8.0 g/L
Digerido péptico de tejido animal	5.0g/L
Digerido pancreático de caseína	16.0g/L
Cloruro de sodio	5.0g/L
Glucosa	2.0g/L
Fosfato disodilo de hidrógeno	2.5g/L
Agar	13.5g/L
pH:7.4 ±0.2	

Tabla 6.Composición de Agar BHI. Fuente: Master Group ltd

Preparación:

- ❖ Disolver 52 g del medio deshidratado en 1 L de agua destilada.
- ❖ Calentar a ebullición hasta su disolución total
- ❖ Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.
- ❖ Distribuir y enfriar a temperatura ambiente.

3. AGAR SANGRE

Composición:

	Concentración del medio
Infusión de músculo de corazón	375.0 g/L
Peptona	10.0 g/L
Cloruro de sodio	5.0 g/L
Agar	15.0 g/L
pH: 7.3 ± 0.2	

Tabla 7. Composición de Agar Sangre. Fuente: Master Group ltd

Preparación:

- ❖ Suspender 40 g del medio deshidratado en 1L de agua destilada
- ❖ Dejar reposar 5 minutos y mezclar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea
- ❖ Calentar con agitación frecuente y dejar hervir 1 minuto
- ❖ Esterilizar 20 minutos a 121°C
- ❖ Enfriar 45-50°C
- ❖ Agregar sangre desfibrinada al 5% en forma aséptica
- ❖ Homogeneizar y distribuir en placas

4. AGAR NUTRITIVO.

Composición:

	Concentración del medio
Pluripeptona	5.0 g/L
Extracto de carne	3.0 g/L
Cloruro de sodio	8.0 g/L
Agar	15.0 g/L
pH: 7.3 ± 0.2	

Tabla 8.Composición de Agar nutritivo. Fuente: Master Group ltd

Preparación:

- ❖ Suspender 31 g del medio deshidratado en 1L de agua destilada
- ❖ Mezclar y dejar reposar 5 minutos
- ❖ Calentar suavemente agitando y dejar hervir por 1 o 2 minutos hasta su disolución completa
- ❖ Esterilizar a 121°C por 15 minutos en autoclave
- ❖ Distribuir y dejar enfriar

ANEXO 3

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)

Composición:

	Concentración solución trabajo 10x
HCl	1M
NaOH	10 M
NaCl	1.380 M
KCl	30 mM
Na ₂ HPO ₄	81 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
dH ₂ O	--
pH: 6.8±0.2	

Tabla 9.Composición de Solución trabajo PBS (10x). Fuente:(Humana, 2008)

Se prepararon 500 ml de una solución PBS 1x a partir de una solución PBS 10x

El primer paso fue esterilizar todo el material a utilizar:

- ❖ Pipetas de diferente volumen
- ❖ Frasco de vidrio para conservar la solución preparada
- ❖ Probeta

Preparación:

Para preparar una solución 1x a partir de una solución 10x se debe realizar una dilución 1/10

Cálculos:

10ml sol----1ml sol 10x

500ml sol—x

X= 50 ml de solución PBS 10x

10 ml sol---9ml agua destilada

500ml sol—x

X= **450ml de solución PBS 10x**

Preparación:

- ❖ Medir 450 ml de agua destilada en una probeta de 500 ml de capacidad.
- ❖ Poner una pequeña cantidad del agua en el frasco estéril
- ❖ En otra probeta medir 50 ml de solución PBS 10x
- ❖ Añadir los 50 ml de solución PBS 10x al agua destilada y completar con el resto de los 450 ml de agua destilada. Al llevar la solución a 1x, el pH se corrige automáticamente a 7.4.
- ❖ Esterilizar la solución preparada PBS 1x en autoclave 15 minutos a 121°C.
- ❖ Conservar en refrigeración



A



B

Figura 48. A. Solución trabajo PBS 10x. **B.** Material utilizado para la elaboración de PBA 1x. Fuente: Elaboración propia

ANEXO 4

ELABORACIÓN DE LA ESCALA DE MC FARLAND

La Escala de McFarland consiste en una serie de tubos hermeticamente cerrados, con una densidad óptica diferente originada por la aparición de un precipitado de sulfato de bario (SO_4Ba) resultante de la reacción entre el Cloruro de bario ($\text{Cl}_2\text{Ba}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1% y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1%.

Para su elaboración se requiere:

- ❖ 10 tubos exactamente iguales y con cierre hermetico
- ❖ 2 Pipetas de 10ml y de 1ml
- ❖ 2 Matraz Erlenmeyer
- ❖ Gradilla
- ❖ Acido sulfúrico al 98%
- ❖ Cloruro de bario 1%

Preparación:

- ❖ Preparar las soluciones a las concentracion deseada

En este caso, para la preparacion del acido sulfurico:

1 ml H_2SO_4 ----- 99ml H_2O destilada= H_2SO_4 al 1%

- ❖ Una vez preparadas las soluciones se prepara el precipitado en cada tubo como se indica en la siguiente tabla:

Escala McFarland	BaCl_2 al 1% (ml)	H_2SO_4 al 1% (ml)	UFC/ml ($\times 10^8$)
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1,0	9,0	30

Tabla 10.Preparación de la Escala de Mc Farland. Fuente:(Gamazo, 2005)

ANEXO 5

FICHA TÉCNICA DE TRABAJO CON ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN

FICHA TÉCNICA UEB-B

Los reactivos biológicos que produce y mantiene la Unidad de Ensayos Biológicos-Bioterio con CATEGORIA I según ICLASse mantienen bajo las siguientes características:

MACROAMBIENTA Controla y mantiene:

- a) Temperatura 20-25-5 °C mediante equipos totalmente controlados y automatizados mediante RELAY CONTROL JHONSON.
- b) Humedad relativa 42 – 62 % mediante equipos totalmente automáticos. EWC ULTRAZONE S2000 REV.B y automatizado mediante RELAY CONTROL JHONSON.
- c) Cambios de aire/hora: 15 - 20 recambios de aire/hora mediante sistema de inyección/extracción de aire filtrado por prefiltro externo con 30 % de eficiencia y filtro interno HEPA de 99.97 % de eficiencia totalmente controlado y automatizado.
- d) La iluminación es artificial con lámparas fluorescentes fijas de 183 LUX para 0,80 m habiéndose incrementado a 300 LUX para cumplir la norma y certificación, metodología y procedimientos del Instituto Nacional de Salud Ocupacional INSO. Los cambios de luz están controladas automáticamente con RELAY TIMER calibrados la duración del fotoperiodo (h/luz x h/oscuridad) es de 12h luz/12h oscuridad (8am/8pm). DOCUMENTADO.
- e) El valor del ruido medido constante es de 58,4 LMP [dB(A)] medido y certificado por el Instituto Nacional de Salud Ocupacional INSO este valor está por debajo de 85 LMP [dB(A)] permitido. DOCUMENTADO.
- f) El olor es controlado por sistema de ventilación automatizado y con la limpieza diaria y cambio de cama según protocolo validado.

MICROAMBIENTE

Se entiende por MICROAMBIENTE, todos los factores que están en contacto directo con el animal como:

- a) Jaula o caja o estabulación: Se cuenta con cajas de policarbonato (PC) transparente autoclavables a 121 °C/250 °F
- b) Tipo de comida su calidad y su tratamiento previo: El alimento para roedores se adquiere de proveedor certificado con certificación de análisis bromatológico y nutricional según método utilizado: AOAC925.10, AOAC960.52, AOAC935.38, AOAC950.37, AOAC938.08, AOAC944.02, AOAC995.11, AOAC140.11, AOAC974.29, AOAC967.21. Se hace control microbiológico de análisis de coliformes totales, enterobacterias, E. coli y levaduras, resultado sin evidencia. El control parasitológico sin evidencia a la fecha de ingreso y cuatrimestral.
- c) Tipo de agua, su calidad y su tratamiento previo: Se realiza control microbiológico del agua potable con los siguientes valores: libres de: recuento para coliformes totales,

aerobios mesófilos, mohos y levaduras. Análisis químico (pH=6.98; turbidez= 0 FTU; color= 0 unidades de color; oxígeno disuelto= 6 ppm; dureza total 232 ppm; amonio y nitrógeno= 0 ppm estos resultados indican totalmente apto para el consumo, el análisis se realiza en forma cuatrimestral y cuando se lo requiere.

- d) Tipo de cama o piso, su calidad y su tratamiento previo: Cama viruta de madera preferentemente de pino previamente cernida, expuesta a luz ultravioleta y esterilizada. Posteriormente se hace control microbiológico y parasitológico siguiendo un protocolo validado. Resultado sin desarrollo.
- e) Densidad del alojamiento: El sistema de enjaulamiento para brindar una ambiente físico y social a los animales de investigación esta protocolizado de acuerdo al peso corporal, el área de piso/animal cm² con un rango de 38,71 a 96.77 cm² y para una altura de 12,7 cm por caja, es así que se cuenta con diferentes tamaños de cajas.
- f) El equipamiento de los locales del alojamiento: La Unidad cuenta con estantería para guardar cajas de diferente tamaño, piso lavable, paredes pintadas con pintura lavable para ser desinfectada. También se cuentan con cajas metabólicas para la recolección de heces y orina.
- g) La cama: (viruta) se cambia cada día según protocolo validado para los adultos y alternado para los pies de cría, se sigue un protocolo para la esterilización: (cernido, expuesto a luz ultravioleta y autoclavado) para las jaulas y bebederos se sigue el protocolo validado (detergente y desinfectante) para cada limpieza.
- h) La eliminación de los desechos biológicos: Se realiza según el manual de normas de bioseguridad con que cuenta el Unidad.
- i) Vestimenta de personal: El personal cuenta con vestimenta apropiada para el ingreso y egreso del Bioterio, botas de goma overol, máscaras con filtros para gases y polvo, guantes de nitrilo, gorro y barbijo, cuenta con las vacunas para tétanos y hepatitis. Se tiene controlado el riesgo ocupacional del personal se cuenta con ducha exclusivamente para el personal.

TÉCNICA DE EUTANASIA:

La UEB-B practica eutanasia física por dislocación cervical método compatible con los objetivos de la investigación en diferentes tiempos a punto final. Es un método de sacrificio humanitario y usado habitualmente para la mayoría de los roedores pequeños (por debajo de 150 gramos (Marshall et al. 1994) produciendo inconsciencia inmediata y muerte, realizado por personal adiestrado y con certificado de BIOÉTICA ANIMAL.

La UEB-B deslinda responsabilidad de otra práctica de eutanasia fuera de sus ambientes.

El responsable de la UEB-B CERTIFICA lo mencionado en favor del proyecto: "Elaboración de Esporotricina (Antígeno de Sporothrixschenckii) para reacciones intradérmicas" realizado en los ambientes de la Unidad durante los meses de noviembre y diciembre del año 2015.

Dr. Juan Antonio Ávila J.
UNIDAD DE ENSAYOS BIOLÓGICOS
BIOTERIO

