



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN DERMATOLOGIA Y SIFILOGRAFIA
INSTITUTO DE BIOMEDICINA DR. JACINTO CONVIT

**USO DE ANTICUERPOS CONTRA EL BCG EN EL DIAGNÓSTICO DE
ESPOROTRICOSIS EN VENEZUELA**

Trabajo Especial de Grado que se presenta para optar al Título de
Especialista en Dermatología y Sifilografía

Colina Flores José Gregorio
Isernia Romero María Cecilia

Tutores:

Cavallera Elsy
Reyes Oscar

Caracas, noviembre 2016.

Dra. Elsy Cavallera

Tutor

Coordinadora del Postgrado de Dermatología y Sifilografía
Servicio autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit
Hospital Vargas de Caracas-Universidad Central de Venezuela

Dr. Oscar Reyes

Co-tutor

Jefe del Departamento de Dermopatología
Servicio autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit
Hospital Vargas de Caracas-Universidad Central de Venezuela

Dr. Ricardo Pérez-Alfonzo

Director del Postgrado de Dermatología y Sifilografía
Servicio autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit
Hospital Vargas de Caracas-Universidad Central de Venezuela

Dr. Jacobus De Waard

Jefe del Departamento de Tuberculosis
Servicio autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit
Hospital Vargas de Caracas-Universidad Central de Venezuela

Dr. Felix J. Tapia

Jefe del servicio de Biología molecular
Servicio autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit
Hospital Vargas de Caracas-Universidad Central de Venezuela

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	4
AGRADECIMIENTOS	6
INTRODUCCIÓN	7
MÉTODOS	16
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	23
RECOMENDACIONES	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXOS	
FICHA DE RECOLECCIÓN	28
CONSENTIMIENTO INFORMADO	29
INDICE DE TABLAS	35
INDICE DE FIGURAS	37

USO DE ANTICUERPOS CONTRA EL BCG EN EL DIAGNÓSTICO DE ESPOROTRICOSIS EN VENEZUELA

José Gregorio Colina Flores, C.I. 17.136.967. Sexo: Masculino, E-mail: drjcolina@gmail.com. Telf: 0424-6472183. Dirección: Avenida el Ejército, El Paraíso, Caracas. Curso de Especialización Dermatología;

María Cecilia Isernia Romero, C.I. 17.446.657. Sexo: Femenino, E-mail: cuore07@hotmail.com. Telf: 0424-8740685/0212-5776837. Dirección: las fuentes, El Paraíso, Caracas. Curso de Especialización en Dermatología

Tutor: **Elsy Cavallera**, C.I. 6.847.642. Sexo: Femenino, E-mail: ecavallera@yahoo.com. Telf: 0414-2628067/0212-6934386. Dirección: Los Chaguaramos, Caracas. Especialista en Dermatología

Tutor: **Oscar Reyes**, C.I. 3.664.142. Sexo: Masculino, E-mail: oreyesjaimes@yahoo.com. Telf: 0416-6258354/0212-8989474. Dirección: Carretera intercomunal, El Hatillo, Caracas. Especialista en Dermatología

RESUMEN

La esporotricosis es una infección micótica subaguda o crónica, causada por las especies del complejo *Sporothrix schenckii* presente en la tierra, restos vegetales y plantas; con una amplia distribución mundial, notable por zonas de alta endemicidad en América Latina. En el presente estudio, se plantea el uso de anticuerpos anti-BCG, como una nueva herramienta diagnóstica para esporotricosis cutánea; ya que el estudio histopatológico aunque es de fácil acceso, no siempre revela el agente vivo. **Objetivo:** Evaluar la eficacia de los anticuerpos anti-BCG para diagnosticar esporotricosis cutánea, en las muestra histopatológicas. **Métodos:** Estudio prospectivo, experimental y longitudinal. Se tomaron 12 biopsias de piel y cultivos micológicos, de los 25 pacientes diagnosticados con esporotricosis, que acudieron a la consulta externa de Micología del Servicio de Dermatología del Hospital Vargas de Caracas, Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, durante un periodo 4 años, desde el 2010 hasta 2014. **Resultados:** Los pacientes estudiados con esporotricosis, en su mayoría eran del sexo femenino en un 58.3%, las cuales eran amas de casa en un 33.3%. El cuadro clínico que predominó fue la forma cutánea fija en un 58.3%, afectando en su mayoría miembros inferiores. El 100% de los pacientes presentaron esporotriquina positiva, 50% tenían directo y cultivos micológicos positivos. 11 de las 12 muestras estudiadas presentaron una tinción de PAS positiva y el 100% de los pacientes tenían inmunohistoquímica positiva. **Conclusiones:** la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-BCG es un método asequible que es capaz de revelar los organismos fúngicos sin reaccionar con estructuras de la piel normal o células inflamatorias.

PALABRAS CLAVE: Esporotricosis, *Sporothrix schenckii*, Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS), Inmunohistoquímica, Anticuerpos policlonales anti-BCG.

ABSTRACT

UTILITY OF ANTIBODIES AGAINST BCG AS A DIAGNOSTIC FOR SPOROTRICHOSIS IN VENEZUELA

Sporotrichosis is a subacute or chronic fungal infection caused by *Sporothrix schenckii* complex species present on earth, plants and plant debris; with an extensive global distribution, it is noted for highly endemic areas in Latin America. In the present study, the use of anti - BCG antibodies as a new diagnostic tool for cutaneous sporotrichosis has been studied; although histopathology is easily accessible it will not always reveal the living pathogen. **Aim:** to evaluate the effectiveness of anti - BCG antibodies to diagnose cutaneous Sporotrichosis on histopathologic sample. **Methods:** A prospective, experimental and longitudinal study. Samples were taken over a period of 4 years, from 2010 to 2014. 12 skin biopsies and mycological cultures were collected from 25 patients diagnosed with sporotrichosis, who attended the outpatient department of Mycology Dermatology Department of Vargas Hospital of Caracas, Institute of Biomedicine Dr. Jacinto Convit. **Results:** Most of the studied patients were women in a 58.3%, which were housewives (33.3). The cutaneous form was the most predominant clinical presentation in 58.3% of the cases, affecting mostly the lower extremities. 100% of patients were positive for sporotrichina and 50% had positive fungal culture. 11 of the 12 samples studied showed a positive PAS stain and 100% of patients had a positive immunohistochemistry. **Conclusion:** immunohistochemical staining with anti- BCG is a feasible method which is capable of to detect fungal organisms not reacting with normal skin structures or inflammatory cells.

KEYWORDS: Sporotrichosis, *Sporotrix schenckii*, Periodic acid–Schiff stain (PAS), Immunohistochemistry, polyclonal anti - BCG antibodies.

AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos especialmente a la Dra. Isabel Hagel, quién nos ayudó con el tratamiento estadístico de los datos, además de brindarnos su apoyo en la revisión del escrito. También es vital agradecer la colaboración de la licenciada Ayarit Villaroel quien realizó las inmunohistoquímicas y los PAS de las biopsias procesadas en parafina. Y como olvidarnos de nuestros asesores, el Dr. Félix Tapia y el Dr. Jacobus de Waard, quienes nos apoyaron en la preparación del anticuerpo policlonal y en la elaboración de nuestro trabajo de investigación.

INTRODUCCIÓN

La esporotricosis es una infección micótica subaguda o crónica, producida por especies del complejo *Sporothrix schenckii*, presente en la tierra, restos vegetales y plantas; con una amplia distribución mundial, notable por zonas de alta endemicidad en América Latina (El Salvador, Uruguay, Colombia, Venezuela, México y Brasil). Afecta principalmente a granjeros, agricultores y veterinarios¹⁻⁴.

El *Sporothrix schenckii* se aisló por primera vez en 1896, por Benjamin Schenck, un estudiante de medicina de la Universidad Johns Hopkins de un paciente masculino de 36 años de edad que presentaba lesiones en la mano derecha y el brazo. El micólogo Erwin Smith, concluyó que el hongo pertenecía al género *Sporotrichum*. En 1900, los investigadores Hektoen y Perkins, nombraron al agente de la esporotricosis como *Sporothrix schenckii*. Esta nomenclatura errónea permaneció hasta 1962, cuando Carmichael reconoce diferencias en las conidias de los miembros del género *Sporotrichum* (hongos basidiomicetos que no son ni dimórfico ni patógeno para los seres humanos u otros animales) y los aislados en los casos de esporotricosis. En 1999, Guarro y col. logran clasificarlo en la división Ascomycota, clase Pyrenomycetes, orden Ophiostomatales, y en la familia Ophiostomataceae⁶.

En Venezuela, la esporotricosis se describió por primera vez en 1935, aunque ha habido varios casos reportados en formas aisladas o en grupos familiares, la prevalencia exacta de esta enfermedad sigue siendo desconocida. Constituye la micosis subcutánea de mayor incidencia en el área urbana. Las zonas más afectadas son los estados centrales, Mérida, Táchira y Bolívar^{5, 6}.

En cuanto al aislamiento de *S. schenckii* del medio ambiente, se realizó por primera vez en la Colonia Tovar, Estado Aragua, en el 2007, orientados por un caso clínico de esporotricosis cutánea fija⁵.

Desde 1984 un pequeño grupo de investigadores, asumieron el reto de iniciar el estudio sistemático de las enfermedades fúngicas, creando los Grupos de Trabajo en Micología de Venezuela (GTMV). Estos grupos realizaron una revisión sistemática de la casuística de las micosis aportadas por los GTMV en el Boletín Informativo “Las Micosis en Venezuela” desde su creación en 1984 hasta el año 2010. En micosis profundas localizadas se registraron 849 casos, con una mayor frecuencia de cromoblastomicosis (n = 553; 65,1%), seguida de esporotricosis (n = 220; 25,9%), micetoma (n = 49; 5,8%) y otras (feohifomicosis, lobomicosis y neumocitosis) (n = 27; 3,2%)⁴.

En un estudio realizado en la sección de Micología del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela, evaluaron en un periodo de 46 años, 133 casos de esporotricosis y la mayor parte de los casos (41,35%) procedían del Estado Aragua, ubicado en la zona centro-norte de Venezuela^{5, 6}.

El *Sporothrix schenckii*, es un organismo ascomiceto dimorfo que durante más de un siglo fue reconocido como el único agente de esporotricosis. Sin embargo, se ha propuesto, con base en los aspectos fisiológicos y moleculares, que el *S. schenckii* es un complejo de especies distintas: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix globosa*, *S. schenckii sensu stricto*, *Sporothrix luriei* y *Sporothrix albicans* (antes *Sporothrix pallida*)^{7, 10}.

Debido al propio fenómeno de dimorfismo del complejo *Sporothrix*, los hongos producen dos tipos de antígenos: M o micelial y L o levaduriforme; ambos tienen una composición química similar. Uno de estos componentes es el péptido rhamno-manna, un polímero cuyas cadenas están constituidas por α -1,6-mannosyl y α -D ácido glucurónico. Esta macromolécula está constituida por un

glicopéptido de casi 16% y una parte polisacáridica que contiene D-manosa (50%), galactosa (1%), L-ramnosa (33%); este último carbohidrato marca la diferencia, debido a que solamente 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 ramno-mananas, y una de las diferencias entre el morfotipo M y el L, es que el primero está constituido por diramnosil-ramnomananas y el segundo por monoramnosil-ramnomananas¹⁷⁻²⁰.

El péptido ramno-manana se puede separar en dos fracciones en función a su afinidad a la lectina concanavalinaA (ConA). La fracción que se une Con-A es relevante para el diagnóstico de esporotricosis en los seres humanos, ya que el péptido es reconocido en el 100% de los sueros de pacientes que sufren esporotricosis cutánea. Dos glicoproteínas de 60 y 70 kDa, nombradas como GP60 y GP70, respectivamente, han demostrado ser los componentes inmunogénicos en la pared celular¹⁷⁻²⁰.

La respuesta inmune celular, o la respuesta Th1, se caracteriza por un aumento en las concentraciones en citocinas tales como IFN- γ , que activa las células efectoras del sistema inmune e IL-12, que induce una mayor producción de IFN- γ y activando los linfocitos T CD8 +¹⁹.

La respuesta Th2 se caracteriza por la presencia de IL-4, que favorece y mantiene el desarrollo de linfocitos Th2, y la IL-10, que inhibe la síntesis de IL-12. Adicionalmente, la producción de anticuerpos es otro rasgo distintivo de la respuesta Th2. Curiosamente, los ratones con esporotricosis muestran una respuesta Th1 durante toda la infección y desarrollan una respuesta Th2 sólo durante las fases más avanzadas. En este sentido, los sueros de ratones Balb/c infectados con *S. schenckii* exhiben una respuesta Th2 que se representa por los isotipos IgG1 e IgG3 específicos para una proteína soluble de 70 kDa¹⁹.

La infección se produce por la inoculación traumática de los hongos existentes en la materia orgánica y los suelos ricos en humus vegetales, o por astillas de madera de la corteza de los eucaliptus y pinos que penetran la piel; a veces las lesiones se propagan por los vasos linfáticos regionales, aunque la diseminación hematogena ha sido infrecuente. Ocasionalmente, el agente es inhalado o llega a la conjuntiva, generando neumonías o blefaroconjuntivitis. Las personas inmunodeprimidas suelen sufrir lesiones extensas y múltiples; el alcoholismo crónico y la diabetes mellitus descontrolada parecerían ser los factores de riesgo en la forma osteoarticular^{1,2}.

La enfermedad tiene una gama de manifestaciones clínicas y se puede clasificar en cutánea fija, linfocutánea, cutánea diseminada y esporotricosis extracutánea^{1,2}.

Como ayuda diagnóstica existe una prueba de alta confiabilidad que es La intradermorreacción con esporotriquina micelial (IRE) se efectúa usando la fracción química del complejo molecular péptido-polisacárido, constituido por ramnomananas (penta y tetrasacáridos) específicos del *S. schenckii*. En la piel se inyecta 0.1 mL del antígeno péptido polisacárido crudo y la lectura se hace a las 48 horas, considerándose positiva cuando la induración es de 5 mm o mayor (esa dosis corresponde aproximadamente a 5×10^7 células/mL). La prueba IRE puede ser diagnosticada con algunos pocos resultados negativos, principalmente en los enfermos inmunodeprimidos (SIDA), con lesiones diseminadas. Las personas sanas habitantes de las áreas endémicas pueden haber tenido una infección previa, subclínica y silenciosa con IRE positiva, o bien, pudieron haber sido expuestos a los antígenos del *S. schenckii* por la ocupación (jardineros, campesinos, trabajadores de los viveros, veterinarios), por ello la IRE se ha usado también en las encuestas epidemiológicas^{22, 23}.

El examen directo de pus o raspado de la lesión no se realiza porque no aporta datos diagnósticos²³. Como lo describen Bonifaz y col. después de múltiples estudios en México, donde evidenciaron que el examen directo no es muy útil para establecer el diagnóstico de esporotricosis porque las levaduras no se ven con las

tinciones convencionales Gram, Giemsa, PAS, Grocott, ya que no hacen las estructuras fúngicas más visibles. Sólo las vieron en 1 a 2% de los casos (formas «en cigarro»), en esporotricosis experimental en ratas y conejos²⁴.

El cultivo es diagnóstico y consiste en la siembra de pus obtenido de los abscesos o del raspado de la lesión, en dextrosa agar de Sabourad, con o sin antibióticos. A temperatura ambiente, el hongo desarrolla colonias húmedas de color crema que luego adoptan una coloración parduzca y finalmente negra, de aspecto coriáceo. Microscópicamente, se identifican hifas ramificadas, finas, tabicadas, con conidios a los lados o en forma de cúmulos (margaritas) en el extremo de los tallos cortos. Los conidios pueden ser redondeados, ovalados o piriformes²³.

La biopsia-punch de la lesión se divide en dos fragmentos: la mitad se usa para el cultivo, y la otra porción se fija en formaldehído al 10% para ser procesada en el laboratorio de histología, por inclusión en parafina y cortes seriados. El método es rápido, resulta mejor cuando el patólogo examina meticulosamente muchos cortes, bien teñidos y con técnicas adecuadas: hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) y metenamina-plata de Gomori (GG)²². La positividad de estas pruebas oscila entre el 50 y el 70%²⁵.

La histopatología está formada por una combinación de imagen granulomatosa supurativa, constituida por tres zonas: la central o crónica con micro-abscesos de polimorfonucleares, histiocitos y linfocitos (es en esta zona donde se llegan a ver los cuerpos asteroides); la segunda zona rodea a la central y presenta una imagen tuberculoide formada por células epitelioides, a cuerpo extraño y células gigantes multinucleadas de tipo Langhans y la tercera zona, o sifiloide, está formada por linfocitos, plasmocitos y fibroblastos^{11, 18}.

Al igual que el examen directo, la histopatología no es patognomónica; en raras ocasiones es posible observar, dentro del granuloma, la levadura única y central,

rodeada por un material eosinofílico, con clavav periféricas, características de los cuerpos asteroides, realmente son depósitos de complejos inmunes depositados y acumulados sobre la superficie vellosa-antigénica de la levadura²². Esta imagen se ha observado en otros procesos, como sarcoidosis, granuloma de Miescher, lepra lepromatosa y reacciones a cuerpo extraño por diversos microorganismos tales como micobacterias no tuberculosas: *Mycobacterium marinum* y *M. Kansasii*; *Pasteurella tularensis*, *Nocardia brasiliensis*, incluso por otros hongos *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *C. posadasii* y *Aspergillus sp*^{18, 25}.

En el 2012 Quintella y col., reportaron en un estudio de 119 pacientes diagnosticados con esporotricosis, que el 84% presentaban granuloma supurativo, mientras que el resto fue tuberculoide; observando levaduras y cuerpo asteroides solo en un 35% de los casos confirmando que solo se ven estas estructuras de forma excepcional⁹.

En la práctica diaria los casos de Leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) y esporotricosis exhiben características clínicas, epidemiológicas, de laboratorio e histopatológicas semejantes, como lo es la presencia de un granuloma por agente vivo, pero en la LTA tiende a ser tuberculoide y en la esporotricosis supurativo^{7, 8}. El examen histopatológico en LTA exhibe una sensibilidad de un 14 a 63,7% y en esporotricosis, la sensibilidad puede variar de 5% a un 80%^{8, 9}. Por tal motivo resulta imperante la identificación del agente etiológico y su aislamiento en el cultivo, a pesar que en algunos casos puedan resultar negativos⁷⁻⁹.

La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales contra *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) se ha utilizado para identificar varias bacterias y hongos, incluyendo *S. schenckii*. Debido a que los anticuerpos anti-BCG no reaccionan con estructuras de la piel normal o células inflamatorias, tienen el potencial de demostrar la presencia del *Sporothrix schenckii*¹¹⁻¹⁵.

En la actualidad contamos con un anticuerpo policlonal de conejo anti *M. bovis* (BCG), disponible comercialmente, que reacciona de forma cruzada con otros microorganismos. Al ser analizado con inmunoelectroforesis cruzada, el anticuerpo reacciona con alrededor de 100 diferentes antígenos de BCG, muchos de los cuales son comunes a otras micobacterias. Algunos de los antígenos son comunes a otras especies. Wiley y col., fueron capaces de detectar organismos de esporotricosis, histoplasmosis, criptococosis, coccidioidomicosis, aspergilosis, y especies de *Cándida* por inmunotinción con anti-BCG; lo cual sugiere la existencia de una antigenicidad compartida entre los diferentes grupos de agentes patógenos¹⁵. La reactividad cruzada mostrada por grupos de organismos fúngicos, resultado de múltiples componentes celulares que ayudan estos microorganismos a parasitar su huésped, nos permite visualizarlos a través de técnicas inmunohistoquímicas¹⁵.

La esporotricosis no es infrecuente y el diagnóstico preciso puede ser un reto para el dermatólogo debido a la dificultad en la identificación del organismo, a pesar de contar con exámenes histopatológicos que son relativamente rápidos, de bajo costo, y ampliamente disponible, no son específicos, al compartir características histopatológicas con otros procesos infecciosos y patológicos, pero si nos permite establecer diagnósticos diferencial con neoplasias, es por ello que se necesita un método fiable de reconocimiento^{9,10}. Como lo es la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-BCG que es un procedimiento asequible, relativamente rápido y fácil, no requiere una formación del personal que labora en los laboratorios de dermatopatología o materiales adicionales¹¹⁻¹⁶.

En el presente estudio, se plantea el uso de anticuerpos anti-BCG, como una nueva herramienta diagnóstica para esporotricosis cutánea; ya que el estudio histopatológico aunque es de fácil acceso, no siempre revela el agente vivo.

Hipótesis

La infección por *Sporothrix schenckii* puede ser un reto para el dermatólogo, por ello existen múltiples métodos para su diagnóstico, entre ellos el cultivo del patógeno y la esporotriquina, sin embargo, en la actualidad se han usado los métodos serológicos, histopatológicos y, recientemente, los moleculares con buenos resultados. Por lo que planteamos la posibilidad de identificar el *Sporothrix sp.* certeramente por inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales anti-BCG en lesiones de piel de pacientes con esporotricosis cutánea.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la eficacia de los anticuerpos anti-BCG para diagnosticar esporotricosis cutánea en la muestra histopatológica, en la consulta externa de Micología en el Servicio de Dermatología del Hospital Vargas de Caracas, Instituto de Biomedicina.

Objetivos específicos

- Identificar el tipo y la localización de las lesiones de los pacientes con esporotricosis.
- Evaluar la asociación entre género y grupo etario en los pacientes con esporotricosis.
- Establecer asociación entre género y ocupación en los pacientes con esporotricosis.
- Evaluar los beneficios de la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales anti-BCG.
- Correlacionar los métodos diagnósticos, cultivo y esporotriquina, con el estudio histopatológico y la inmunohistoquímica.

Aspectos éticos

Este trabajo fue evaluado por la comisión de ética del Servicio autónomo instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit.

Realizándose bajo los principios de ética internacional establecidos en el código de Núremberg de 1946, según el primer principio que estipula lo siguiente “El consentimiento voluntario del ser humano es absolutamente esencial”. Así como apeguándose a la declaración de Helsinki en 1963, en el párrafo 11, 3, 14, y 22 la cual especifica lo que le participante de la investigación tiene que saber para tomar una decisión informada con la utilización del consentimiento informado y cumpliendo con las pautas éticas internacionales para la investigación Biomédica.

Se realizó un consentimiento informado a cada paciente incluido en el estudio, en los casos de pacientes menores de edad el consentimiento fue realizado por sus padres.

MÉTODOS

Tipo de estudio: Estudio retro-prospectivo, experimental, longitudinal.

Población y muestra:

De los 25 pacientes con esporotricosis cutánea que acudieron a la consulta externa de Micología del Servicio de Dermatología del Hospital Vargas de Caracas, Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, durante un periodo 4 años, desde el 2010 hasta 2014; solo a 12 se les realizó estudio histopatológico. La mayoría provenían del Estado Aragua (Colonia Tovar) y de Miranda (Paracotos, Petare, Guarenas).

Criterios de inclusión:

- Pacientes de ambos géneros.
- Pacientes con edades comprendidas entre 5-70 años.
- Pacientes que aceptaron voluntariamente participar en el estudio, previo consentimiento informado (Anexo1).
- Sin tratamientos previos.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con enfermedades mentales que impidan su colaboración en el estudio y condiciones del mismo.
- Pacientes con otras enfermedades dermatológicas.
- Pacientes con riesgo quirúrgico.

Variables del estudio

Variables Cuantitativas: Edad y número de lesiones.

Variables Cualitativas: género, ocupación, tipos de esporotricosis, localización de las lesiones, resultados de cultivos micológicos, esporotriquina, tinción con PAS e inmunohistoquímica con anticuerpos anti-BCG.

Tratamiento Estadístico:

Los datos fueron recogidos y analizados con el paquete estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS), para Windows 7. El análisis estadístico se realizó con tablas de frecuencia y porcentajes.

Procedimientos

Materiales y pacientes

1. Se seleccionaron 12 biopsias procesadas en parafina, de los 25 pacientes que fueron diagnosticados con esporotricosis, con cultivo confirmatorio, en la consulta de Micología del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, previo consentimiento informado (Anexo 1).
2. La información clínico-epidemiológica (antecedentes personales, dirección, edad, género, ocupación, localización de lesiones, número de lesiones, esporotriquina, directo micológico, cultivo micológico) se obtuvo de las historias médicas ubicadas en el archivo de registros médicos del Hospital Vargas.
3. Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina y ácido periódico de Schiff (PAS) fueron revisadas por un dermatólogo del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit.

Preparación del Anticuerpo policlonal anti-BCG

Antígeno usado: Se reconstituyó la vacuna BCG (Staten Serum Institute, Dinamarca), en medio de Sauton, durante 3 horas, a temperatura ambiente.

Animales utilizados: 3 hembras de conejo (*Oryctolagus cuniculus*, raza New Zealand White). Peso de los animales: entre 900 y 1100 gramos.

Inmunización: se inoculó 200µl de la vacuna de BCG reconstituido en el muslo de la pata izquierda de cada conejo, que corresponde entre 200.000-500.000 bacterias por cada inoculación. La inoculación se realizó cada 3 semanas en un total de 5 ciclos.

Obtención del suero policlonal: Tres semanas después de la última inoculación se extrajo por punción en el corazón, aproximadamente 50 ml de sangre de cada animal en un tubo de centrifuga tipo Falcon de 50 ml. Después de la coagulación se centrifugó el tubo a 3000 g por 10 minutos. El suero que contiene los anticuerpos policlonales anti-BCG fue congelado a -70 grados celsius en proporciones de 10 ml.

Procesamiento inmunohistoquímico: Seleccionados los bloques para el estudio inmunohistoquímico se hicieron cortes de dos micras de los casos a estudiar y de los controles adecuados para cada anticuerpo, en láminas silanizadas (DAKOCytomation cat. S3003) los cuales fueron secados en la estufa a 56° C por 30 minutos, y luego desparafinados en tres baños de xileno de 5 minutos cada uno y luego por tres baños de alcoholes decrecientes (90%,80%,70%) hasta hidratar en agua. Luego se hizo recuperación antigénica con buffer citrato pH 6.2, tween20 0,05% durante 60 minutos en vaporera marca comercial Oster, posteriormente se inhibió la peroxidasa endógena con un baño de peróxido de hidrógeno al 2% por diez minutos.

Los anticuerpos usados para detectar el antígeno fueron anticuerpos policlonales anti-BCG a una dilución de 1:50, que fueron incubados por 1 hora a temperatura ambiente. El sistema de detección usado fue de streptavidina –HRP, Starr Trekk Universal HRP system (Biocare cat STUHRP700) se hizo el revelado con 3-amino-9-etil-carbazol y contrastado con Hematoxilina de Meyer.

Detección de esporotricosis: las muestras inmunoteñidas con el anticuerpo policlonal anti-BCG se consideraron positivas cuando los organismos se tiñeron de

color rojo por el sistema de detección de estreptavidina-biotina. Se realizaron controles positivos en 2 biopsias de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y con infección por *Mycobacterium leprae*, que previamente firmaron el consentimiento informado. Estas muestras histológicas se obtuvieron de los archivos del Departamento de Dermatopatología del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit.

ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

Recursos humanos y materiales:

Formaron parte del estudio dos residentes del 2 año del postgrado de dermatología, un dermatólogo clínico, un dermatopatólogo y 2 expertos en Microbiología y Biología molecular.

Tinción con Hematoxilina-eosina

Ácido periódico de Shiff (PAS)

3 hembras de conejo (*Orhyctolagus cuniculus*, raza New Zealand White)

200µl de la vacuna liofilizado de BCG

Inyectoras de insulina

Alcohol (90%,80%,70%)

Láminas silanizadas (DAKOCytomation cat. S3003)

Algodón

Medio de Sauton

Anticuerpos policlonales anti- BCG, titulación 1:25.

Anticuerpos Anti-IgG conejo

Tubo de centrifuga tipo Falcon de 50 ml.

Vaporera marca comercial Oster

Sistema de detección estreptavidina-biotina–HRP, Starr Trekk Universal HRP system (Biocare cat STUHRP700)

Cromógeno 3-amino-9-etil-carbazol

Resultados

El total de muestras estudiadas de pacientes con esporotricosis fue 12. En la tabla N°1 se observa la relación entre género y grupo etario. Se evidenció que el sexo femenino predominó en un 58,3% (7/12) sobre todo en el grupo etario de 11 a 21 años en el 28,6% (2/7) y de 44 a 54 años (28,6%). El sexo masculino representó 41,6% (5/12), correspondiendo al grupo etario de 33 a 43 años en un 60% (3/5).

Los pacientes estudiados con esporotricosis, en su mayoría eran mujeres amas de casa en un 33,3% (4/12) y le seguían los estudiantes con un 25% (3/12), así lo expresa la tabla N°2.

En la tabla N°3, se distribuyeron los pacientes según presentación clínica y ubicación de las lesiones, observándose la forma de esporotricosis cutánea fija en un 58,3% (7/12) y 57,14% (4/7) de ellos se ubicaban en miembros inferiores. El 41,6% presentaron esporotricosis cutánea linfática (5/12) siendo afectados los miembros superiores en un 100% (5/5).

En la tabla N°4 se distribuyen los pacientes según presentación clínica y métodos diagnósticos; todos los pacientes tenían una esporotriquina positiva y el 50% de los pacientes tenían directo y cultivo micológico positivo. Al realizarle técnicas de tinción especiales a las biopsias, se determinó que 11 de las 12 muestras estudiadas presentaron una tinción de PAS positiva y que el 100% de los pacientes tenían inmunohistoquímica positiva.

Discusión

En Venezuela, se conoce que en la mayoría de los casos de esporotricosis diagnosticados, se trata de pacientes con una edad promedio de 30 años, seguidos muy de cerca por individuos menores de 15 años. Alvarado y col. reportaron que el género que presenta más infecciones por el complejo *Sporothrix schenckii* es el masculino en un 71,4% siendo la esporotricosis linfangítica la forma clínica más frecuente en un 63,15%, la mayoría de los pacientes reportados en este estudio son estudiantes en un 37,6% especialmente con edades por debajo de los 15 años, seguido por los agricultores (29,3%) y amas de casa (6,8%).²¹

En nuestra investigación el sexo predominante es el femenino, sobre todo en el grupo etario de 11 a 21 años y de 44 a 54 años. El sexo masculino representó 41,6%, correspondiendo al grupo etario de 33 a 43 años.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Espinosa-Texis y col., en un estudio realizado con 50 pacientes mexicanos, con diagnóstico clínico de esporotricosis cutánea, en el cual demostraron una mayor frecuencia de esporotricosis en mujeres (62%), en menores de 20 años (34%) y mayores de 50 años (28%).²

Sin embargo en nuestro estudio, los pacientes estudiados con esporotricosis, en su mayoría eran mujeres amas de casa y le seguían los estudiantes, mientras que en el estudio realizado en México predominaron los campesinos².

En relación a la forma clínica nuestro estudio demostró que la esporotricosis cutánea fija es predominante y afecta principalmente miembros inferiores. Luego le sigue la esporotricosis cutánea linfática con lesiones en miembros superiores.

Nuestros resultados difieren a los obtenidos en México, donde predominó la forma linfangítica en el 82% de los pacientes y localizada principalmente en extremidades superiores (54%)². La literatura no reporta muchos trabajos para comparar y concluir sobre la forma predominante y su localización.

Wiley y col., estudiaron 41 casos de infección por micobacterias utilizando anticuerpos policlonales de conejo (Dako) frente a *M. bovis*, cepa BCG, *M. duvalii* (MD), y *M. paratuberculosis* (MP). Encontraron que no sólo varias cepas de micobacterias reaccionan con los anticuerpos en biopsias de tejidos, sino que algunos organismos fúngicos utilizados como controles negativos también lo hicieron. Y reportaron que nueve de los 13 casos de esporotricosis diagnosticados por cultivo, se tiñeron con el anticuerpo anti-MP solamente en las formas de levadura, con un color rojo brillante de las paredes celulares³.

En nuestro estudio al aplicar las técnicas de tinciones especiales a las biopsias, se determinó que 11 de las 12 muestras estudiadas presentaron una tinción de PAS positiva y que el 100% de los pacientes tenían inmunohistoquímica positiva revelando los organismos fúngicos de color rosado. El color obtenido por la tinción es más claro que el reportado en un trabajo anterior (Byrd y col.), en el cual usaron un anticuerpo policlonal anti-BCG de conejo, con una titulación de 1:1000 producido por Dako, en 13 biopsias procesadas en parafina de pacientes con esporotricosis; 6 de las 13 biopsias teñidas con PAS revelaron las esporas y en todas las inmunotinciones se mostraron los organismos fúngicos de un color rojo brillante¹¹.

Las diferencias observadas en cuanto al color en las fotografías que representan la tinción obtenida en este trabajo respecto al de Byrd y Wiley podrían deberse a la sensibilidad del anticuerpo utilizado o a diferencias en cuanto a la edición de la fotografía. En este trabajo se utilizó un anticuerpo policlonal con una titulación de 1:50, producido en el Instituto en cambio los usados en las investigaciones antes mencionadas, fueron anticuerpos policlonales comerciales producidos en óptimas condiciones a una dilución de 1:1000.

Cuando se analizan los resultados en función a las patologías se encontró que en los pacientes con esporotricosis cutánea fija, la inmunohistoquímica y la tinción con PAS fueron igualmente sensibles que la esporotriquina, porque de los 7 pacientes positivos a esporotriquina, 7 lo eran también en IHQ y PAS.

En cambio en los pacientes con esporotricosis cutánea linfática, el cultivo micológico y la IHQ fueron más sensibles que el directo micológico y el PAS, tomando en cuenta que en estos pacientes la esporotriquina actuó como gold estándar. Debido a que son pocos pacientes no se puede calcular especificidad y sensibilidad de la técnica. Por lo que, valdría la pena hacerlo en futuras líneas de investigación.

Conclusiones

La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales anti-BCG permite identificar los organismos fúngicos sin reaccionar con estructuras de la piel normal o células inflamatorias.

La utilización del PAS mostró una alta sensibilidad al compararlo con el gold estandar que es la esporotriquina. Lo cual lo hace una alternativa diagnóstica.

Recomendaciones

Debido a que el número de pacientes es muy bajo no se puede calcular con un margen de confiabilidad adecuado la sensibilidad y especificidad de las técnicas por lo que sería de interés ampliar el número de pacientes para confirmar los resultados obtenidos.

En próximos trabajos de investigación, sería de interés, usar otro sistema de detección en las inmunotinciones, utilizando otros cromógenos, diferente al usado por nosotros, para que las esporas de dichos organismos fúngicos sean de más fácil visualización para el operador.

Sería bueno comparar los resultados obtenidos con la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales contra *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) empleada en el trabajo con sueros de conejos inmunizados con *Sporothrix schenckii* mediante técnicas moleculares PCR usando primers contra *Sporothrix schenckii*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bravo T. Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. *Rev Latinoamer Patol Clin*. 2012; 59 (3):147–171.
2. Espinosa-Texis A, Hernández-Hernández F, Lavalle P, Barba-Rubio J, López-Martínez R. Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio. *Gac Med Méx*. 2001; 137 (2): 111-116.
3. Almeida-Paes R, De Oliveira M, Freitas D, Do Valle A, Zancopé-Oliveira R, Gutierrez-Galhardo M. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015; 8(9):e3094.
4. Martínez D, Hernández R, Alvarado P, Mendoza M. Las micosis en Venezuela: casuística de los Grupos de Trabajo en Micología (1984-2010). *Rev Iberoam Micol*. 2013; 30(1):39–46.
5. Mendoza M, Diaz E, Alvarado P, Romero E, Bastardo de Albornoz M. Aislamiento de *Sporothrix schenckii* del medio ambiente en Venezuela. *Rev Iberoam Micol*. 2007; 24: 317-319
6. Mata-Essayag S, Delgado A, Colella MT, Landaeta-Nezer ME, Rosello A, Perez de Salazar C, et al. Epidemiology of sporotrichosis in Venezuela. *Int J Dermatol*. 2013; 52(8):974–80.
7. Barros MBDL, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbial Rev*. 2011; 24(4):633–654.
8. Quintella LP, Passos SRL, de Miranda LHM, Cuzzi T, Barros MBDL, Francesconi-do-Vale a C, et al. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *Br J Dermatol*. 2012; 167 (4):837–846.
9. Quintella LP, Passos SRL, do Vale ACF, Galhardo MCG, Barros MBDL, Cuzzi T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol*. 2011 38(1):25–32.

10. De Oliveira M, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo M, Zancope-Oliveira R. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. Rev Iberoam Micol. 2014; 31(1):2–6.
11. Byrd J, Mehregan D, Mehregan D. Utility of anti-bacillus Calmette-Guérin antibodies as a screen for organisms in sporotrichoid infections. J Am Acad Dermatol. 2001; 44(2):261–264.
12. De Oliveira M, Sampaio P, Almeida-Paes R, Pais C, Gutierrez-Galhardo M, Zancope-Oliveira R. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. J Clin Microbiol. 2012; 50(6):2159–62.
13. Wiley E, Beck B, Freeman R. Reactivity of fungal organisms in tissue sections using anti-mycobacteria antibodies. J Cutan Pathol. 1991; 18: 204-209
14. Hu S, Chung W-H, Hung S-I, Ho H-C, Wang Z-W, Chen C-H, et al. Detection of *Sporothrix schenckii* in Clinical Samples by a Nested PCR Assay. J Clin Microbiol. 2003; 41(4):1414–1418.
15. Kutzner H, Argenyi ZB, Requena L, Rütten A, Hügel H. A new application of BCG antibody for rapid screening of various tissue microorganisms. J Am Acad Dermatol. 1998; 38(1):56–60.
16. Reis R, Almeida-paes R, Muniz M, Morais P, Cezar P, Monteiro F, et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(5):769–74.
17. Bonifaz A, Araiza J, Pérez A, Ochoa L, Toriello C. Prueba intradérmica con esporotriquina en una comunidad de la Sierra Norte de Puebla. Dermatol Rev Mex. 2013; 57: 428-432.
18. Bonifaz A. Micología Médica Básica. Cuarta edición. México: McGraw-Hill interamericana editores, S.A. de CV; 2012.
19. Alba-Fierro C, Pérez-Torres A, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M, Ruiz-Baca E. Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents. Rev Iberoam Micol. 2014;31(1):86–89
20. Ruiz-Baca E, Torriello C, Perez-Torres A, Sabanero-Lopez M, Villagomez-Castro J, López-Romero E. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa

(Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. *Medical Mycology*. 2009; 47:185-196.

21. Alvarado P, Ostos A, Franquiz N, Roschman-González A, Zambrano E, Mendoza M. Diagnóstico serológico de la esporotricosis mediante el empleo del antígeno de micelio de *Sporothrix schenckii sensu stricto*. *Invest Clin* 2015; 56(2):111–122.
22. Carrada T. Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. *Rev Latinoamer Patol Clin*. 2012; 59 (3): 147-171.
23. Rambotti de Alvarez O, Pasquali P, Pérez de Arvelaez F, Páez E. Esporotricosis: presentación de un caso de difícil diagnóstico. *Dermatología venezolana*. 1992; 30 (3):126-128.
24. Bonifaz A, Vázquez-González D. Sporotrichosis: Un update. *G Ital Dermatol Venerol* 2010; 145: 659-673.
25. Orellana A, Moreno-Coutiño M, Poletti E, Vega M, Arenas R. Esporotricosis fija con cuerpo asteroide junto al fragmento Vegetal. *Rev Iberoam Micol*. 2009; 26(4):250–254.

ANEXOS

Ficha de recolección

Fecha:

NºPaciente:

Iniciales paciente:

Sexo:

F	M
---	---

País de Nacimiento:

Edad:

Telf:

Dirección:

Ocupación:

Antecedentes personales:

Antecedentes familiares:

Presentación clínica y número de lesiones:

Esporotricosis cutánea fija	Esporotricosis cutánea linfática
--------------------------------	----------------------------------------

Ubicación de lesiones:

Pruebas diagnósticas:

Esporotriquina	Directo micológico	Cultivo micológico	Biopsia HE	PAS	IHQ

Tratamiento y tiempo de duración:

Itraconazol	Ioduro de potasio
-------------	-------------------

Consentimiento informado

El Instituto de Biomedicina, es una institución dedicada al servicio de la salud, docencia e investigación. El Bienestar de nuestros pacientes es fundamental para nuestras actividades. Nuestra Institución cumple con los principios de Responsabilidad, No maleficencia, Justicia Beneficencia, Autonomía, Precaución, y Ponderación de los principios bioéticos.

Título de la investigación: Uso de anticuerpos contra el BCG en el diagnóstico de esporotricosis en Venezuela.

Introducción: Uso de anticuerpos contra el BCG en el diagnóstico de esporotricosis en Venezuela.

La esporotricosis es una infección micótica subaguda o crónica, causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii* presente en los suelos; con una amplia distribución mundial, notable por zonas de alta endemicidad en América Latina.

La infección es causada por la inoculación traumática de los hongos existentes en la materia orgánica y los suelos ricos en humus vegetales, o por astillas de madera de la corteza de los eucaliptus y pinos que penetran la piel; a veces las lesiones se propagan por los vasos linfáticos regionales, aunque la diseminación hematológica ha sido infrecuente.

El estándar de oro para el diagnóstico de esporotricosis es el cultivo del patógeno, sin embargo, los métodos serológicos, histopatológicos y, recientemente, los moleculares se han usado para el diagnóstico de esta micosis.

Más recientemente, la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales contra *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) se ha utilizado para identificar varias

bacterias y hongos, incluyendo *S. schenckii*. Debido a que los anticuerpos anti-BCG no reaccionan con estructuras de la piel normal o células inflamatorias, tienen el potencial de demostrar la presencia del *Sporothrix schenckii*.

Por ello se llevará a cabo esta investigación para evaluar la eficacia de los anticuerpos anti-BCG para diagnosticar esporotricosis cutánea en la consulta externa de Micología en el Servicio de Dermatología del Hospital Vargas de Caracas, Instituto de Biomedicina.

Se tomarán 12 biopsias de piel de pacientes diagnosticados con esporotricosis y 2 biopsias de piel de pacientes diagnosticados con *Mycobacterium lepra* y *Leishmania sp.* provenientes de los archivos del Departamento de Dermopatología del Hospital Vargas de Caracas, Instituto de Biomedicina durante un periodo de 4 años, 2010-2014.

Nombre/apellidos del paciente: _____

No. de historia: _____

Nombres/apellidos de los médicos: Dra. María Isernia y Dr. José Colina

Teléfono: 0424-8740685/ 0424-6472183

Fecha: _____

Mediante la presente, yo _____

CI _____ hago constar que fui informado por el Dr.

_____ C.I. _____ que se me realizará una historia

clínica en la Institución, la cual puede ser en forma física como digital. Los datos

que aportaré a dicha historia quedarán registrados con mi nombre y número de

historia, así mismo se registrarán mis exámenes de laboratorio, resultados de

procedimientos, tratamiento, material fotográfico y evolución, que serán utilizados

con los siguientes fines:

Médicos: ser revisados por médicos o enfermeras que participen en el tratamiento de mi enfermedad en esta institución, bajo un registro computarizado confidencial al que se tendrá acceso solo por el personal autorizado con clave, para que no pueda ser evaluado por otras personas que no participen directamente en mi tratamiento.

Docentes: dar clases a estudiantes de postgrado en dermatología cumpliendo con todos los principios de confidencialidad y de bioética

Investigativos: realizar estudios de investigación, respetando mis datos personales, documentos de identidad u otra forma en que se me pueda identificar en dichos estudios. El mantenimiento de la confidencialidad permitirá hacer publicaciones en el futuro que beneficien el conmovedor científico en función del bienestar colectivo.

Así como los datos se están en conocimiento que las muestras biológicas que se tomen para los análisis podrán pasar a formar parte de los biobancos de la Institución, los cuales cumplen con las reglas bioéticas de resguardo de la confidencialidad y almacenamiento correcto de las mismas.

El almacenamiento de mis datos y muestras biológicas es voluntario, puedo negarme a registrar los datos en la historia en forma física y/o digital así como donar mis muestras biológicas con fines médicos, docentes e investigación, sin que esto afecte mi atención médica en la Institución.

Así mismo, dichos datos digitalizados serán almacenados en la computadora central de la Institución, Podrán ser utilizados por autoridades competentes cuando la ley lo exija o con el objeto de reporte de las enfermedades de notificación obligatoria con fines epidemiológicos respetando la ley vigente y la confidencialidad del paciente.

Declaro que he sido informado por el médico de poder revocar en cualquier momento mi consentimiento.

Estoy satisfecho con la información recibida, he podido formular todas las preguntas que he creído conveniente y me han aclarado todas las dudas planteadas.

1.- En consecuencia, doy mi Consentimiento para que se lleve a cabo la recolección de datos en la historia digital y muestras biológicas. _____(marcar con X)

2.- En consecuencia NO doy mi Consentimiento para que se lleve a cabo la recolección de datos en la historia digital y muestras biológicas. _____(marcar con X)

Firma del paciente: _____ C.I.: _____

Teléfono celular: _____ Teléfono fijo: _____

Firma del Médico: _____ C.I.: _____

Teléfono celular: _____ Teléfono fijo: _____

Aplica si ___ no ___

Nombre del representante legal en caso de ser menor de edad ó tener discapacidad el paciente, con indicación del carácter con el que interviene (padre, madre, tutor, etc.).

Nombre del representante legal _____

Firma _____ C.I. _____

Relación con el paciente _____

Número de teléfono fijo _____ Número de teléfono celular

TESTIGO 1

Nombre/Apellido _____ C.I.

Número de teléfono fijo _____ Número de teléfono celular

TESTIGO 2

Nombre/Apellido _____ C.I.

Número de teléfono fijo _____ Número de teléfono celular

Revocación del consentimiento informado

En _____ fecha _____ revoco el consentimiento prestado para el uso de mis datos clínicos y las muestras biológicas para los fines médicos, docencia e investigación

Firma del paciente _____

Firma del médico _____

Aplica si ___ no ___

Nombre del representante legal en caso de ser menor de edad ó tener discapacidad el paciente, con indicación del carácter con el que interviene (padre, madre, tutor, etc.).

Nombre del representante legal _____

Firma _____ C.I. _____

Relación con el paciente _____

Número de teléfono fijo _____ Número de teléfono celular _____

TABLAS

Tabla n°1: Distribución de pacientes con Esporotricosis según grupo etario y género

Grupos etarios	Femenino	Masculino	Total
5-10 años	1	0	1
11-21 años	2	0	2
22-32 años	1	0	1
33-43 años	0	3	3
44-54 años	2	1	3
55-70 años	1	1	2
Total	7	5	12

Tabla n°2: Distribución de pacientes con Esporotricosis según ocupación y género

Ocupación	Femenino	Masculino	Total
Estudiante	3	0	3
Agricultor	0	2	2
Floristero	0	1	1
Ama de casa	4	0	4
Profesor	0	2	2
Total	7	5	12

Tabla nº 3: Distribución de pacientes con Esporotricosis según presentación clínica y localización de las lesiones.

Presentación clínica	*MSD	**MSI	***MII	****MID	Cara	Total
Esporotricosis cutánea fija	1	1	2	2	1	7
Esporotricosis cutánea linfática	2	3	0	0	0	5
Total	3	4	2	2	1	12

*MSD: miembro superior derecho

**MSI: miembro inferior izquierdo

***MII: miembro inferior izquierdo

****MID: miembro inferior derecho

Tabla nº 4: Distribución de pacientes con Esporotricosis según presentación clínico y métodos diagnósticos

Presentación clínica	Directo		Cultivo	*IHQ	**PAS
	Esporotriquina	micológico	micológico		
	+	+	+		
Esporotricosis cutánea fija (7)	7	3	5	7	7
Esporotricosis cutánea linfática (5)	5	3	5	5	4
Total	12	6	10	12	11

*IHQ: inmunohistoquímica

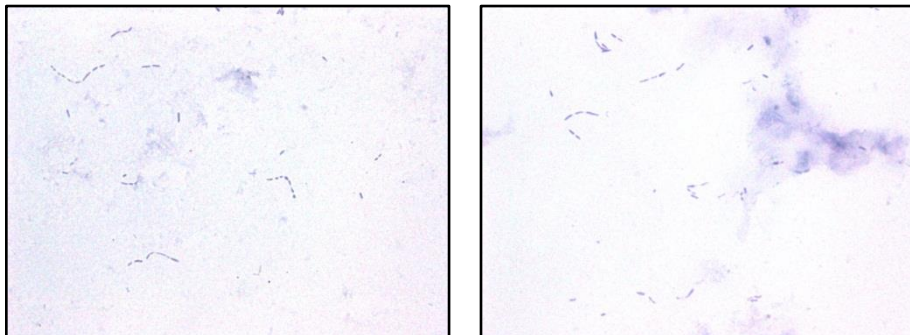
** PAS: ácido periódico de Shiff

Figuras

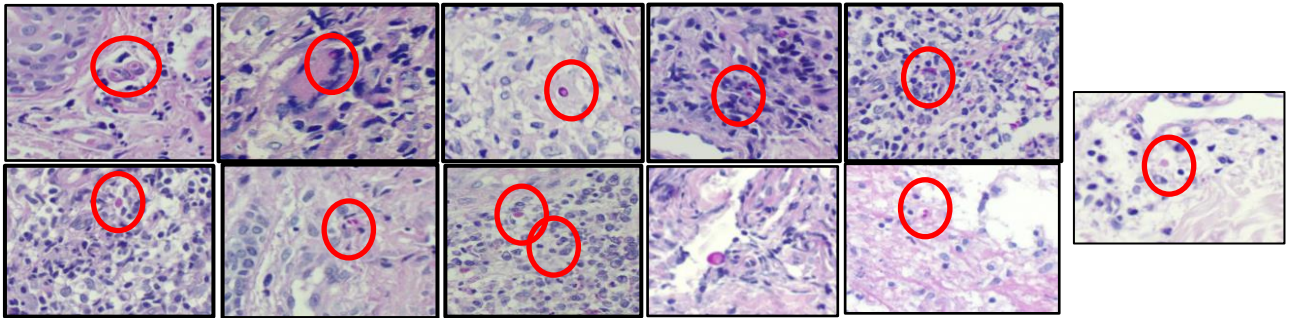
Fotografías n°1,2 ,3. Preparación del anticuerpo anti- BCG



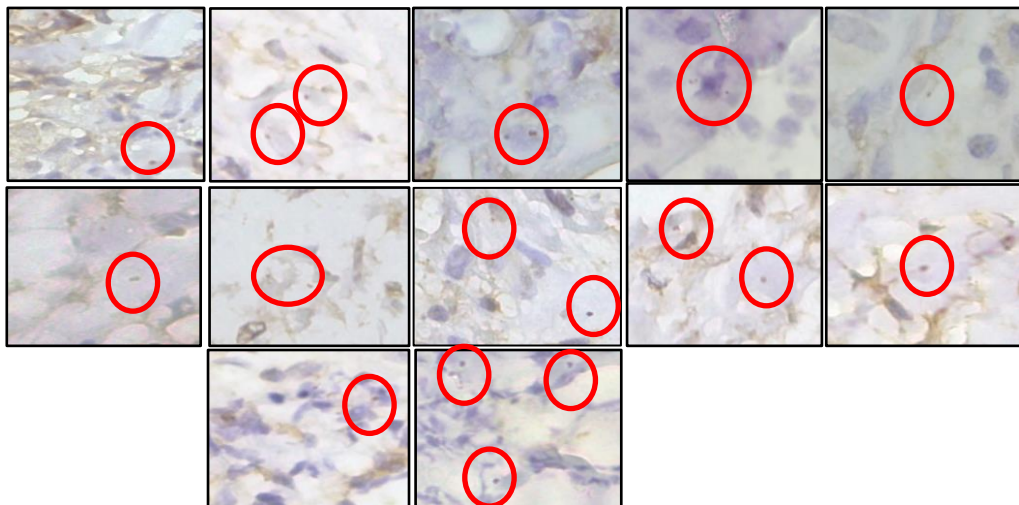
Fotografías n°4, 5. Frotis de *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) a través de microscopía óptica 40x.



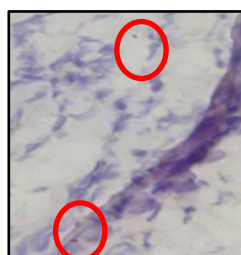
Fotografías n° 6-16 Cortes de 11 biopsias de pacientes con esporotricosis, teñidos con PAS, revelan esporas ovals de color fucsia (magnificación de 40x).



Fotografías n°17-28. Inmunohistoquímica de 12 biopsias de pacientes con esporotricosis, revelan organismos de color fucsia (magnificación de 100x).



Fotografía n°29. Inmunohistoquímica de biopsia de paciente con Leishmaniasis cutánea localizada, revelan organismos de color fucsia (magnificación de 100x).



Fotografía n°30. Inmunohistoquímica de biopsia de paciente con *Mycobacterium leprae*, revelan organismos de color fucsia (magnificación de 100x).

