

Inmunoanálisis enzimático (ELISA) en la evolución terapéutica de la cromoblastomycosis por *Cladophialophora carrionii* en el área endémica del Estado Falcón, Venezuela

Lairet Oberto-Perdigón¹, Hilda Romero², Maigualida Pérez-Blanco¹ y Rafael Apitz-Castro³

¹Laboratorio de Micología, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro; ²Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela y ³Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar la técnica de ELISA indirecta en pacientes con cromoblastomycosis causada por *Cladophialophora carrionii*, antes, durante y después del tratamiento con ajoeno o itraconazol, y en personas sanas del área endémica del Estado Falcón. Se seleccionaron 94 personas, 10 con cromoblastomycosis y 84 sanas (45 familiares y 39 no familiares). A todas las personas se les realizó una evaluación clínica; a aquellas con lesiones sugestivas de cromoblastomycosis se les confirmó el diagnóstico con estudios micológicos (exámenes directos y cultivos), repitiendo este procedimiento durante la terapia (45 días) y al final de la misma (90 días). Cinco pacientes con lesiones ≤ 5 cm recibieron ajoeno y cinco con lesiones > 5 cm, itraconazol. La remisión clínico-micológica (60%) fue similar en ambos grupos de pacientes, confirmándose ésta al final del tratamiento, y persistió tres meses postratamiento. Con el método de ELISA se analizaron 114 sueros: 30 de 10 pacientes con cromoblastomycosis antes, durante y después del tratamiento, 45 de familiares y 39 de no familiares, utilizando un antígeno somático (AgSPP) de *C. carrionii*. Todos los pacientes resultaron positivos antes del tratamiento, dos se negativizaron al día 45 y seis en total estaban negativos tres meses postratamiento. Las personas sanas resultaron negativas. La sensibilidad y especificidad fue de 100% y 98,9% respectivamente. El estudio micológico mostró una relación del 100% con el inmunoserológico pre- y postratamiento. Se concluye que el ELISA es una herramienta valiosa para el diagnóstico y evolución de la eficacia terapéutica en pacientes con cromoblastomycosis, por lo cual se recomienda la inclusión del estudio inmunoserológico, utilizando ELISA, como un nuevo criterio de remisión aunado a los ya establecidos.

Palabras clave

Inmunoanálisis enzimático, ELISA, *Cladophialophora carrionii*, Ajoeno, Itraconazol, Cromoblastomycosis

Dirección para correspondencia:

Lic. Lairet Oberto-Perdigón
Laboratorio de Micología
Centro de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda
Fundación Borregales, Calle Zamora, Coro,
Falcón, Apartado postal 7373, Venezuela
Tel.: +58 268 252 9998 / 9855; Fax: +58 0268 252 1668
Correo electrónico: lairetop2@hotmail.com

Aceptado para publicación el 22 de febrero de 2005

An ELISA test for the study of the therapeutic evolution of chromoblastomycosis by *Cladophialophora carrionii* in the endemic area of Falcon State, Venezuela

Summary

The purpose of this research was to evaluate an ELISA indirect method in patients with chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii*. Samples collected before, during and posttreatment with ajoene or itraconazole, and those from apparently healthy people from the endemic area were evaluated with the ELISA test. 94 individuals were studied, 10 with chromoblastomycosis, and 84 apparently healthy subjects. All of them were evaluated by clinical-dermatological examinations. On those with lesions suggestive of chromoblastomycosis, mycological studies were carried out to confirm the disease. This approach was repeated during and at the end of therapy. Five patients with lesions ≤ 5 cms were treated with ajoene and five with lesions > 5 cms, received itraconazole. Mycological cure (60%) was similar in both groups of patients and persisted three months after therapy. One hundred and fourteen sera were analyzed by ELISA, 30 from 10 patients with chromoblastomycosis, before, during and posttreatment and 84 from apparently healthy people, using a somatic antigen of *C. carrionii* (AgSPP). All patients with chromoblastomycosis were positive before-treatment, two became negative on day 45 of treatment and a total of six patients were negative three months post-treatment. All sera from apparently healthy individuals were negative. The sensitivity and specificity was 100% and 98.9%, respectively. The relationship between clinical-mycological studies and the ELISA assay was 100% before and after treatment. In summary, ELISA could be a valuable tool for the diagnosis and evolution of the therapeutic efficacy in patients with chromomycosis (*C. carrionii*). The use of an ELISA test is therefore highly recommended to establish remission criteria in chromoblastomycosis caused by *C. carrionii*.

Key words

ELISA, *Cladophialophora carrionii*, Ajoene, Itraconazole, Chromoblastomycosis

La cromoblastomycosis, enfermedad granulomatosa crónica, es causada por varios hongos con melanina, siendo *Fonsecaea pedrosoi* y *Cladophialophora carrionii* sus agentes causales predominantes [27]. En el tratamiento de esta micosis se han usado diversos métodos y fármacos [3-5,10,11,14,17] y, para determinar su eficacia real, se han establecido criterios de remisión, basados en la evaluación de los aspectos clínicos, micológicos e histopatológicos de las lesiones y del seguimiento de los pacientes [3]. La técnica de inmunoanálisis enzimático (ELISA) se ha empleado para el serodiagnóstico de enfermedades fúngicas [18,19,22,23] y en la evaluación de pacientes con cromoblastomycosis tratados con terbinafina, así como en un estudio seroepidemiológico en una área endémica de cromoblastomycosis (*F. pedrosoi*) [6-8]. El área endémica de la cromoblastomycosis en Venezuela está ubicada en la región noroccidental (Falcón, Lara y Zulia) y la mayoría de los casos provienen de la zona semiárida del estado Falcón [1,2,24]. La evaluación inmunoserológica de pacientes con cromoblastomycosis, así como de familiares y no familiares que habitan en dicha zona aportaría un mejor conocimiento de la endemia a través de la detección de cromoblastomycosis asintomática. A su vez contribuiría con el establecimiento de un nuevo criterio de remisión, el inmunoserológico, puesto que se contaría con una herramienta que, aunada al estudio clínico y micológico, permitiría evaluar la eficacia en el tiempo, de los métodos y fármacos empleadas para el control de esta micosis. En vista de que las terapias con ajoene e itraconazol han resultado eficaces en pacientes con cromoblastomycosis (*C. carrionii*), para lesiones localizadas y extensas respectivamente [16,17], se planteó como objetivo evaluar la técnica de ELISA en pacientes con cromoblastomycosis (*C. carrionii*) antes, durante y después del tratamiento con ajoene o itraconazol y en personas sanas habitantes del área endémica.

Pacientes y métodos

Población. Se establecieron tres grupos de estudio: a) Diez pacientes con cromoblastomycosis causada por *C. carrionii*, b) 45 personas sanas familiares directos de los pacientes con cromoblastomycosis, c) 39 personas sanas sin nexo familiar con estos pacientes. Todos menores de 65 años, de ambos sexos, habitantes de la zona endémica del estado Falcón y expuestos a las mismas condiciones de riesgo (Tabla 1). Estos individuos manifestaron por escrito (consentimiento informado) su voluntad de participar en el protocolo. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética para Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM).

Evaluación clínico-micológica. A todos los individuos integrantes de los grupos en estudio se les realizó una evaluación clínico-dermatológica consistente en la inspección de piel, mucosa y anexos cutáneos a fin de detectar lesiones sugestivas de cromoblastomycosis. A los que presentaron lesiones sugestivas de cromoblastomycosis, se les confirmó el diagnóstico mediante un examen directo de las escamocostras con KOH al 10% y siembra en medio de cultivo Lactritmel con cloranfenicol 250 mg/l [27], repitiendo este procedimiento 45 días después de iniciado el tratamiento y al final de la terapia (90 días).

Tratamientos. Los cinco pacientes que presentaron lesión única (pápula o placa escamocostrosa), con diámetro ≤ 5 cm (media: $3,93 \pm 4,91$ cm) y tiempo de evolución entre 0,5 y 4 años (media: $1,30 \pm 2,32$ años), recibieron terapia con ajoene al 0,5% en gel, aplicado sobre las lesiones con cura oclusiva una vez al día durante tres meses [16]; los cinco pacientes con lesiones > 5 cm de diámetro (media: $202,25 \pm 487$ cm) y tiempo de evolución entre 0,5 y 14 años (media: $4,89 \pm 6,25$ años) recibieron itraconazol (cápsulas de 100 mg) una vez al día con los alimentos

Tabla 1. Características demográficas de pacientes con cromoblastomicosis (*C. carrionii*) y de personas sanas.

Personas evaluadas (n = 94)	n	Edad (media ± SD)	Sexo	
			Mujer	Varón
Pacientes	10	39,2 ± 13,7	1	9
Personas sanas				
Familiares ascendientes	12	65,2 ± 15,2	7	5
Familiares descendientes	7	16,6 ± 8,5	3	4
Hermanos completos	26	40,2 ± 12,5	13	13
No familiares	39	41,9 ± 20,7	21	19

durante tres meses [4,5,17]. A estos pacientes se les realizaron evaluaciones hematológicas, hepáticas y renal antes, durante y después del tratamiento. La eficacia de ambos tratamientos se evaluó según los criterios establecidos por Bayle [3] cambios de la expresión clínica de la enfermedad (desaparición de prurito, escamo-costra y cicatrización de las lesiones), negativización de los cultivos y ausencia de recaídas durante el lapso de seguimiento postratamiento. El cumplimiento de los dos primeros criterios determinó la remisión de la enfermedad.

Estudio inmunoserológico. Se analizaron un total de 114 muestras de sueros provenientes de: a) 30 de diez pacientes con cromoblastomicosis causada por *C. carrionii*. Se tomaron tres muestras de sangre a cada uno de los pacientes: la primera al momento del diagnóstico, la segunda 45 días después de iniciada la terapia antifúngica y la tercera 90 días después de finalizada la misma; b) 45 de familiares directos de los pacientes con cromoblastomicosis y c) 39 de personas sanas sin nexo familiar con estos pacientes. A las personas de los grupos b y c se les tomó una muestra de sangre.

Para obtener antígeno somático de *C. carrionii* (AgSPP) se utilizó la cepa pp8201 aislada de un paciente con cromoblastomicosis de la zona semiárida del estado Falcón y se siguió la metodología descrita por Romero y cols. [20,21] a partir de la fase logarítmica de crecimiento del hongo. La determinación de proteínas del AgSPP se realizó según el método de Lowry [12] modificado por Markwell [13].

Se empleó un método de ELISA indirecto, según Voller [25], con las modificaciones de Romero y cols. [19]. Las tiras de micro-ELISA, poliestireno, Immulon 4 (Dynatech lab. Inc, EE.UU.), se sensibilizaron con 2,5 µg de proteínas del AgSPP, diluido en 50 µl del tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Los sueros se diluyeron 1:200; el conjugado (anti-inmunoglobulinas humanas polivalentes marcadas con peroxidasa, Sigma Chemical EE.UU.) se diluyó 1:4000 y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro microplate microreader III (Hyperion Inc, EE.UU.). Todas las pruebas incluyeron controles de antígeno, tres sueros positivos y tres sueros negativos de referencia (sueros de sujetos sanos que no habitan la zona de riesgo). El punto de corte se estableció utilizando las muestras negativas de personas sanas (39), habitantes del área endémica, sin nexo familiar con los pacientes con cromoblastomicosis.

Punto de corte = $P_{SN} + 3 \times SD$ (P_{SN} = Promedio de las densidades ópticas (DO) de los sueros negativos; SD = Desviación estándar de las DO de los sueros negativos).

La sensibilidad y especificidad de la prueba se determinaron utilizando las fórmulas de Galen y Gambino [9].

Para el análisis estadístico se usaron las pruebas de t de student y de comparación de dos porcentajes por la transformación arcoseno, mediante el programa SPSS 10.0 para Windows.

Resultados

Evaluación clínico-micológica y terapéutica. La negativización de los cultivos fue similar en ambos grupos de pacientes; cuatro de los pacientes (dos de cada grupo) fueron negativos 45 días después de iniciada la terapia antifúngica y otros dos al final de ella (uno de cada grupo), obteniendo así la negativización de los cultivos en seis de los diez pacientes tratados (tres de cada grupo). La remisión clínico-micológica se confirmó a los 90 días de tratamiento, indistintamente de la terapia aplicada y persistió tres meses postratamiento (Tabla 2).

Los dos pacientes que no respondieron favorablemente al tratamiento con ajoeno recibieron itraconazol según el esquema establecido en este estudio y a los dos pacientes que no remitieron con itraconazol se les prolongó la terapia con el mismo fármaco y/o se incrementó la dosis a 200 mg/día. Las personas sanas no mostraron lesiones sugestivas de cromoblastomicosis al examen clínico.

Inmunoanálisis enzimático (ELISA) con sueros humanos. Todas las muestras de los pacientes fueron positivas antes del tratamiento, con densidades ópticas entre 1,132 y 2,099; 45 días después de iniciada la terapia antifúngica, dos de ellos se negativizaron (del grupo tratado con itraconazol) y 90 días después de finalizada la misma, se negativizaron otros cuatro (tres de los tratados con ajoeno y uno de los tratados con itraconazol). Cuatro pacientes permanecieron positivos 90 días postratamiento, dos del grupo de los tratados con ajoeno y dos de los tratados con itraconazol.

Ninguna de las 45 muestras de sueros de familiares mostró positividad con esta técnica, con DO promedio de 0,147 (Figura 1 A,B,C y tabla 2).

Evaluación del método. El punto de corte fue de 0,282 (DO). El método mostró una sensibilidad de 100% y una especificidad de 98,9%.

Relación micro-serológica. El estudio micológico mostró una relación del 100% con el estudio inmunoserológico (ELISA), pre- y postratamiento (Tabla 2).

Discusión

La cromoblastomicosis es una enfermedad para la cual se han establecido criterios de remisión [3] y la inclusión del criterio inmunoserológico permitiría confirmar el diagnóstico y evaluar en el tiempo la eficacia de los métodos y fármacos empleados. En la evaluación clínico-micológica de los grupos de pacientes se observó una remisión del 60%, con negativización micológica al finalizar el tratamiento (90 días) en ambos grupos, resultados que confirman que la evaluación clínicomicológica juega un papel fundamental en el diagnóstico de esta micosis. También se

Tabla 2. Relación micoserológica de pacientes con cromoblastomycosis tratados con ajoeno o itraconazol.

	Paciente nº	Estudio micológico			Estudio serológico (ELISA)		
		Pre-T	45 días	90 días	Pre-T	45 días	Pos-T
Ajoeno	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	-	-	+	+	-
	3	+	+	-	+	+	-
	4	+	+	+	+	+	+
	5	+	-	-	+	+	-
Itraconazol	6	+	+	-	+	+	-
	7	+	+	+	+	+	+
	8	+	-	-	+	-	-
	9	+	-	-	+	-	-
	10	+	+	+	+	+	+

Pre-T: Pretratamiento; 45 días: Días después del comienzo de la terapia; 90 días: Final de tratamiento; Post-T: Tres meses postratamiento

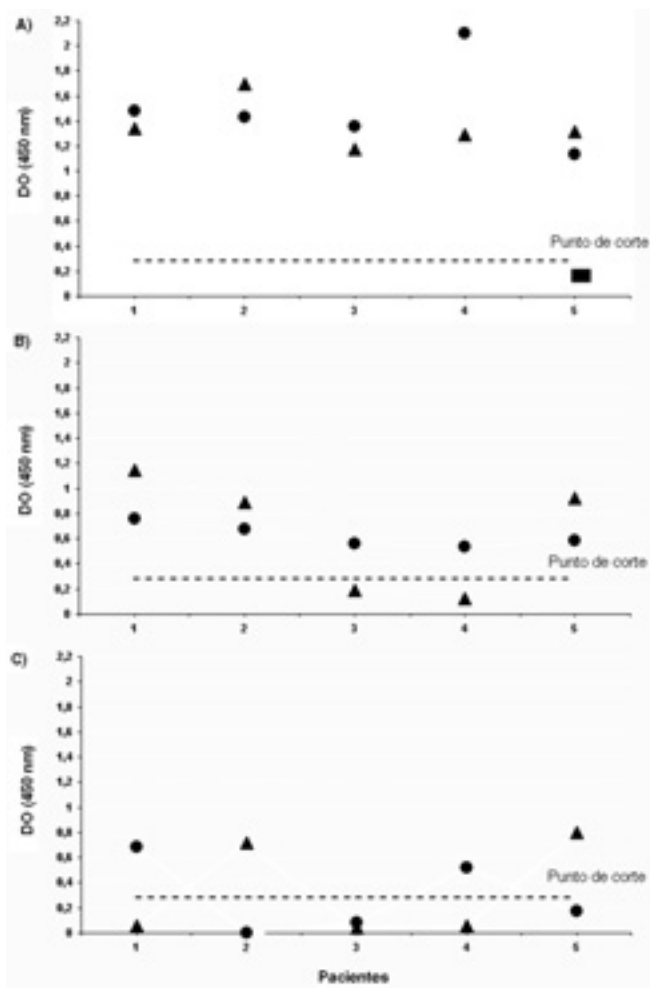


Figura 1. ELISA en la evolución de pacientes con cromoblastomycosis (*C. carrionii*) tratados con ajoeno ● o itraconazol ▲
 ■ Media de DO de sueros (n=45) de familiares
 A) Pretratamiento, B) Durante el tratamiento, C) Postratamiento

ratifica que la terapia con ajoeno en lesiones localizadas y con itraconazol en lesiones extensas son eficaces [5,16,17]. Se escogió la prueba de ELISA debido a que ha sido reportada como sensible, específica, fácil de realizar y reproducible en el estudio de esta enfermedad [8,19]. El punto de corte fue de 0,282, lo que concuerda con lo descrito en informes previos [19]. Al evaluar la reactividad del AgSPP con los diez sueros de los pacientes antes de ser tratados, éstos resultaron positivos, corroborando así la aplicabili-

dad de esta técnica en el diagnóstico de la cromoblastomycosis [8,19]. Cuatro de los diez pacientes permanecieron positivos al final del protocolo, aunque hubo disminución de sus DO, resultados similares a lo señalado en pacientes con cromoblastomycosis causada por *F. pedrosoi* utilizando esta metodología [8]. La sensibilidad y especificidad obtenidas coinciden con estudios previos [8,19]. En el presente estudio se demuestra que la evaluación clínicomicológica es comparable con la inmunoserológica, independientemente de la terapia aplicada, similar a lo reportado en un protocolo con pacientes con cromoblastomycosis (*F. pedrosoi*) tratados con terbinafina [8]. Debido a que se ha informado la presencia de casos asintomáticos (6,2%) en personas sanas (374) de áreas endémicas y no endémicas de *F. pedrosoi* utilizando ELISA [7] y que se ha señalado heredabilidad en la susceptibilidad a cromoblastomycosis [15,26], se decidió explorar la prevalencia de cromoblastomycosis asintomática en personas sanas familiares y sin nexo familiar de los pacientes con cromoblastomycosis (*C. carrionii*) que habitan en la zona endémica; ninguna muestra resultó positiva. Sería necesario realizar un ensayo con un número mayor de personas sanas, procedentes del área endémica de Falcón, e incluir pruebas intradérmicas a fin de establecer un criterio concluyente y tener un mejor conocimiento de la endemia. En conclusión, el ELISA, altamente sensible y específica, es útil en la orientación diagnóstica de pacientes con cromoblastomycosis (*C. carrionii*) y para establecer la eficacia de la terapia implementada en esta micosis. Recomendamos incluir el estudio inmunoserológico en los pacientes con cromoblastomycosis causada por *C. carrionii* usando la técnica de ELISA como un nuevo criterio de remisión de la enfermedad.

Los autores desean expresar su agradecimiento a las siguientes personas que de una u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo: Rosaura Hernández, Catalina Rey, Alberto García, Joel Torres, Javier Benavides, a los pacientes y personas sanas por su participación voluntaria en esta investigación, a la cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, UCV. Este trabajo fue parcialmente financiado por el Centro de Investigaciones Biomédicas, UNEFM. CI: TEG. 2002-190, Fondo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (FONACIT). Pem: 2001001749 y Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) Proyecto N° 0912-4911-01. Universidad Central de Venezuela.

Bibliografía

1. Archivos del Laboratorio de Micología, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, Estado Falcón, Venezuela. Casuística 1982-2003.
2. Barroeta S, Mejías de Alejos MA, Franco de Arias C, Prado A, Zamora R. Cromomicosis en el Estado Lara. *Dermatol Venez* 1986; 24: 134-137.
3. Bayles MAH. Chromomycosis. *Baillieres Clin Trop Med Commun Dis* 1989; 4: 45-70.
4. Bayles MAH. Tropical mycoses. *Chemotherapy* 1992; S1: 27-34.
5. De Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Atilili Angelis D, Gerrits Van Den Ende AHG, Matos T, Peltroche-Llacsahuanga H, Pizzirani-Kleiners AA, Rainer J, Richard-Yegres N, Vicente V, Yegres F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol* 2000; 38: 243-250.
6. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Romarcel ER, Pecarrece JL. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar. A review. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 45-47.
7. Esterre P, Jahevitra M, Ramarcel E, Andriantsimahavandy A. Evaluation of the ELISA technique for the diagnosis and the seroepidemiology of chromoblastomycosis. *J Mycol Med* 1997; 7: 137-141.
8. Esterre P, Jahevitra M, Andriantsimahavandy A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 497-500.
9. Galen R, Gambino S. Beyond normality. The predictive value in medical diagnosis. New York, Wiley, 1975.
10. Grupta AK, Taborda PR, Sanzovo AD. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol* 2002; 40: 529-534.
11. Guerriero C, De Simone C, Tulli A. A case of chromoblastomycosis due to *Phialophora verrucosa* responding to treatment with fluconazole. *Eur J Dermatol* 1998; 8: 167-168.
12. Lowry O, Rosebrough N, Farr L, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
13. Markwell M, Haas S, Bieber L, Tolbert N. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87: 206-210.
14. Medina E, González R, Yegres F, Richard-Yegres N. 5-Fluorouracilo tóxico (5%): Alternativa terapéutica en cromomicosis por *Cladosporium carrionii* en la zona semiárida del Estado Falcón. *Arch Venez Farmacol Ter* 1987; 6: 204-206.
15. Naranjo F, Vilera L, Arrese-Igor N, Richard-Yegres N, Yegres F, Chirino H, Weffer R. Cromomicosis por *Cladophialophora carrionii*: Estudio del componente genético en la zona endémica en Venezuela. *Bol Soc Venez Microbiol* 1998; 18: 67-70.
16. Pérez-Blanco M, Hernández-Valles R, Fernández-Zeppenfeldt G, Apitz-Castro R. Ajoene and 5-fluorouracil in the topical treatment of *Cladophialophora carrionii* chromoblastomycosis in humans: a comparative open study. *Med Mycol* 2003; 41: 517-520.
17. Pérez-Blanco M, Yegres F, Richard-Yegres N, Humbria L, Hernández R, Zeppenfeldt G. Itraconazol: Eficacia en cromomicosis por *Cladosporium carrionii*. *Dermatol venez* 1994; 32: 13-16.
18. Pires de Camargo Z, Fabiano de Franco M. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 41-48.
19. Romero H, Ferrara G, Pérez-Blanco M, Contreras I. An ELISA test for the serodiagnosis of chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii*. *J Mycol Med* 1999; 9: 210-213.
20. Romero H, Guedes E, Magaldi S. Evaluation of immunoprecipitation techniques in chromoblastomycosis. *J Mycol Med* 1996; 6: 83-87.
21. Sánchez-Mirt A, Romero H, Fernández-Zeppenfeldt G. Growth and morphology of *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii*. *J Mycol Med* 1997; 7: 1-4.
22. Shell WA. Agents of chromoblastomycosis and sporotrichosis. En: Ajello L, Hay RJ (Eds.) *Medical Mycology*, Vol 4, Topley & Wilson Microbiology and Microbial Infections (9th Ed.) New York, 1998: 315-323.
23. Tiraboshi Y, Marticorena B, Negroni R. ELISA en coccidioidomycosis humana. *Rev Inst Med Trop* 1991; 33: 281-285.
24. Vargas-Montiel H. Cromomicosis en el Estado Zulia. *Dermatol venez* 1986; 24: 134-137.
25. Voller A, Bartlett A, Bidwell E. Enzyme immunoassay with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 1978; 31: 20.
26. Yegüez-Rodríguez J, Richard-Yegres N, Yegres F, Rodríguez-Laralde A. Cromomicosis: Susceptibilidad genética en grupos familiares de la zona endémica en Venezuela. *Acta Cient Venez* 1992; 43: 98-102.
27. Yegres F, Richard-Yegres N, Pérez-Blanco M. Cromomicosis. En: María CB de Albornoz (Eds.) *Temas de Micología Médica*. Caracas, 1996: 87-98.