

Introducción

La esporotricosis es una micosis por implantación que afecta piel, tejido celular subcutáneo y vasos y ganglios linfáticos. Es producida por diferentes especies de *Sporothrix* spp. Las especies que más frecuentemente generan micosis en el ser humano son *S. schenckii* (sensu stricto), *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. ljungii*. En la actualidad el paradigma de esta micosis está en continua revisión dado que en la región se han reportado casos de esporotricosis por *S. brasiliensis* con características de enfermedad invasiva y comportamiento zoonótico. Por este motivo en la actualidad interesa saber cuáles son las especies circulantes en nuestro país capaces de generar penicilia.

Para la identificación de género el cultivo sigue siendo el patrón oro sin embargo en la actualidad cada vez presenta menos sensibilidad para la identificación a nivel de especie. Es así que métodos como el PCR y MALDI-TOF se han vuelto indispensables para la caracterización a nivel de especie. El objetivo del presente trabajo fue implementar la espectrometría de masas en el diagnóstico de aislamientos de *Sporothrix* spp.

Objetivo general

Implementar la espectrometría de masas en el diagnóstico de aislamientos de *Sporothrix* spp.

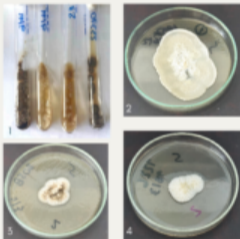


Fig 1 1, 2 y 4 Cultivos de *Sporothrix* spp. agar Sabouraud

Resultados

Logramos poner a punto la espectrofotometría de masas para la identificación de *Sporothrix schenckii* a partir de cepas en fase filamentosa.

La totalidad de las cepas fueron analizadas por triplicado, durante cada lectura en el equipo MALDI-TOF. De las 13 cepas estudiadas, 7 se identificaron como *Sporothrix schenckii* y 1 fue identificada como *Lomentospora prolificans*. Obtuvimos una correlación a nivel de género moderada ($k=0,48$). La cepa identificada como *L. prolificans* se almacenó para el análisis posterior.

Respecto a la identificación mediante el equipo MALDI-TOF y la comparación con su base de datos las cepas identificadas *Sporothrix schenckii*, 4 presentaron un score $\geq 1,7$ por lo que son aceptables a nivel de género y especie, 2 cepas tuvieron un score entre 1,5 y 1,6, por lo cual se considera una identificación por este método como confiable a nivel de género. Para las 5 cepas restantes no se obtuvieron espectros que fueran capaces de permitir la identificación de las mismas.

Una vez obtenidos los espectros procedimos a analizarlos en la base de datos MSI y en la base de datos abierta Microbesat de CDC, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Discusión

Los resultados obtenidos mediante la base de datos de MALDI-TOF eran los esperados, dado que la base de datos de Bruker no tiene espectros compatibles con otras especies de *Sporothrix* no *schenckii* por lo cual, dada la similitud de los espectros era aceptable para la identificación de la sensibilidad a

Materiales y métodos

Identificación mediante técnicas convencionales: Las cepas fueron sembradas en agar Sabouraud deshidratado en placas de Petri e incubadas a 28°C durante 14 días. Una vez obtenido el crecimiento de colonias macroscópicamente compatibles con *Sporothrix* spp. se comprobó la pureza de las mismas mediante observación microscópica con lactofenol. Para estudiar las características microscópicas de la fase micelial, los aislamientos se cultivaron en portadientes loativos en láminas con agar Sabouraud. Los mismos se incubaron a 28°C durante 14 a 21 días y posteriormente fueron examinados bajo un microscopio óptico. Se evaluaron las características de los filamentos y elementos de reproducción aseuada del hongo, los conidios, evaluando forma, disposición y coloración de los mismos. Con estas características utilizando claves identificatorias que utilizamos con cada cepa, los identificamos a nivel de género y de especie de acuerdo a las mismas.

Identificación por espectrometría de masas: Todas las cepas de *Sporothrix* spp. se identificaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. Para el procedimiento de extracción de proteínas utilizamos el protocolo publicado por Casagrande et al. Para el análisis de los espectros obtenidos utilizamos el software MALDI: BiotopeTM 3.0 (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania).

Interpretación de resultados siguiendo los siguientes criterios: Identificación aceptable a nivel de especie y género, cuando el score sea $\geq 1,7$. Los scores menores de 1,5 y mayores o iguales a 1,5 se considerarán como identificación aceptable solo a nivel de género, y scores $< 1,5$ se tomarán como identificación no confiable. Para establecer un género o especie diferente, se considerará necesaria una diferencia mínima de 10% entre el score superior y el más próximo.

Procesamiento de datos: realización de tablas con las distintas características y datos obtenidos de cada aislamiento.

Análisis de resultados: Análisis de los datos obtenidos mediante las distintas técnicas utilizadas en el proyecto, comparación con los datos obtenidos por otros autores y discusión al respecto. Utilizamos para comparar ambos resultados el test de corrección de kappa.

ID de Cepa	Resultado de ID MALDI TOF	Resultado MSI y Microbesat
1917	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,83)	<i>Sporothrix schenckii</i> (Plot A Score 21,75)
2095	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,81)	<i>Sporothrix schenckii</i> (Plot A Score 28,75)
1994	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,51)	<i>Sporothrix schenckii</i> (Plot C Score 17,45)
23270	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,54)	<i>Sporothrix schenckii</i> (Plot C Score 17,4)
1942	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,77)	<i>Sporothrix brasiliensis</i> (Plot C Score 19,28)
2056	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 2,01)	<i>Sporothrix schenckii</i> (Plot A Score 22,00)
2100	<i>Sporothrix schenckii</i> (Score 1,58)	<i>Sporothrix brasiliensis</i> (Plot B Score 22,52)
158	<i>Lomentospora prolificans</i> (Score 2,25)	<i>Lomentospora prolificans</i> (Score 22,00)
28	Sin identificación	Sin identificación