

VIABILIDAD DE DERMATOFITOS EN MUESTRAS CLINICAS ALMACENADAS

(Viability of dermatophytes in stored clinical samples)

Zaror, L.¹ & Bustamante, X.²

¹Instituto de Microbiología Clínica y ²Escuela de Tecnología Médica; Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Casilla 567, Valdivia, Chile. E-mail: lzaror@valdivia.uca.uach.cl

Palabras clave: Muestras clínicas, dermatofitos, viabilidad.
Key word: Clinical samples, dermatophytes, viability.

RESUMEN

Con la finalidad de determinar la viabilidad en el tiempo de las estructuras fúngicas de dermatofitos y levaduras en muestras clínicas almacenadas, se estudiaron 257 muestras (2 a 7 años de antigüedad) colectadas entre Enero de 1990 y Diciembre de 1994 (206 de uña, 43 de piel y 8 de pelo).

El examen microscópico directo se realizó con KOH-tinta Parker y posterior cultivo en Agar Sabouraud-CAF y Agar Lactrimiel-CAF por 10-15 días a 28°C.

Como controles se analizaron con la misma metodología, 33 muestras de 5-8 meses de almacenamiento.

En el 100% de las muestras control, se observaron elementos fúngicos y solo en el 21,2% de las almacenadas durante 5-6 meses se logró aislar nuevamente el agente causal. La especie más detectada fue *T. rubrum*.

El 70,4% de las muestras almacenadas por un período superior a los 8 meses presentaron estructuras fúngicas al examen microscópico, sin embargo, todos sus cultivos resultaron negativos.

INTRODUCCION

Los dermatofitos son hongos filamentosos capaces de digerir y obtener nutrientes que requieren y utilizan para su crecimiento. la queratina de: piel, pelo y uñas (Larone, 1995). Por ende, las infecciones que producen están limitadas a los tejidos superficiales (Freeman, 1989).

Los agentes etiológicos de las dermatofitosis son clasificados en tres géneros anamórficos, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, dependiendo de las características de sus macroconidios (Rippon, 1974; Díaz *et al.*, 1984; Koneman & Glen, 1985; Kwon-Chung & Bennett, 1992; Larone, 1995).

SUMMARY

In order to assess time viability of fungal structures from dermatophytes and yeast in clinical stored samples, 257 of them (206 nail, 43 skin and 8 hair samples) collected within January 1990 and December 1994 were examined (2-7 years old) Direct microscopic observation was carried out with these samples using KOH-Parker ink and later culture in Sabouraud-CAF agar and Lactrimel-CAF for 10-15 days at 28°C.

As a measure of control, 33 samples with a 5-8 month storage were analyzed as with the same methodology.

The 100% of control samples exhibited fungal elements whereas in only 21,2% of samples stored for 5-6 months it was possible to isolate once more the causing agent. The species most highly detected was *T. rubrum*.

The 70,4% of samples stored for a period greater than 8 months revealed fungal structures under a microscopic exam yet their cultures were negative.

Coincidiendo con la información disponible en Chile las especies frecuentemente implicadas, siguen siendo *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* y *Microsporum canis*, (Zaror *et al.* 1982, 1988; Díaz *et al.*, 1984).

Además, se informan casos de micosis de tipo oportunistas superficiales por *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus candidus* y *Fusarium dimerum* (Zaror & Frick, 1980; Zaror *et al.*, 1984; Negroni, 1984).

En el diagnóstico de las dermatofitosis debe hacerse siempre examen directo y cultivo, este último, permite comprobar cual es su agente patógeno y con ello poder deducir la evaluación que puede tener el proceso, conocer su fuente de origen y establecer el tratamiento (Perciro, 1982).

La sobrevivencia de dermatofitos en uñas, pelos y piel, ha sido objeto de diversos estudios. Existen algunos trabajos que reconocen la viabilidad de algunos dermatofitos colectados y preservados bajo distintas condiciones (Glass 1948; Keep, 1960; Rosenthal & Vanbreuseghem, 1962; Dvórák & Hubálek 1968).

Glass (1948), encontró que en pelos infectados con *M. audouinii*; el hongo crecía, después de estar envuelto en papel durante 479 días y *M. canis* no era aislado si permanecía almacenado por 348 días o más.

Keep (1960), logró recultivar tres cepas de *M. canis* aisladas de gatos, después de ser mantenidas en placas en el laboratorio a temperatura ambiente. La viabilidad de *M. canis* en estos casos de tinca en felinos fue de 323, 315 y 422 días, respectivamente.

Rosenthal & Vanbreuseghem (1962), demostraron que algunos dermatofitos al ser mantenidos por algún tiempo, almacenados en tubos estériles y envueltos individualmente en papel, pudieron ser reaislados con su morfología original. Este estudio se realizó con siete especies. *T. violaceum*, *T. ferrugineum*, *T. verrucosum* y *T. kuryanegi* tuvieron el más alto porcentaje de sobrevivencia; *T. sudanense* y *T. youndei* sobrevivieron bien por dos años, mientras que *S. langeroni* (*Microsporium langeroni*) fue el de menor viabilidad.

Dvórák & Hubálek (1968), aislaron de escamas de lesiones humanas *T. mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. rubrum* y *T. verrucosum*, los que fueron preservados en tubos tapados y mantenidos a temperatura ambiente por 6 a 66 meses. El menos viable fue *T. rubrum*, ya que no pudo ser reaislado de ninguna de las muestras con más de 6 meses de almacenamiento. Al contrario, *T. verrucosum* fue el más resistente. *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* mostró una viabilidad menor a 9 meses, mientras que *T. mentagrophytes* se reaisló después de 15 meses. Ningún dermatofito fue capaz de crecer después de un período de almacenaje superior a 20 meses (Dvórák & Hubálek, 1968).

La información acerca de viabilidad de dermatofitos en muestras clínicas es limitada e insuficiente, sin embargo, los datos disponibles en la literatura coinciden en que la mayoría de éstos tienen una sobrevivencia limitada en muestras clínicas.

Nuestro objetivo fue estudiar la viabilidad de dermatofitos presentes en muestras clínicas almacenadas por períodos prolongados.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 257 muestras clínicas obtenidas de pacientes atendidos en el Instituto de Microbiología Clínica de la Universidad Austral de Chile, entre Enero 1990 y Diciembre de 1994.

Las muestras fueron procesadas originalmente en ese período, mediante examen microscópico directo y cultivo; posteriormente se almacenó el remanente de la muestra clínica (raspado de piel, uñas y pelos) entre dos portaobjetos envueltos en papel.

Del total de muestras, 206 correspondieron a uñas, 43 a piel y 8 a pelos y considerando el tiempo de inicio de nuestra investigación, se establece que las muestras a examinar, tuvieron un tiempo mínimo de almacenamiento de 2 años y un máximo de 7.

Como controles positivos para la viabilidad, se sembraron 33 muestras cuyo tiempo de almacenaje fue de solo 5-8 meses. Estas fueron recolectadas entre Enero y Noviembre de 1996, esta última marca el inicio de nuestra investigación.

Para el examen microscópico directo de escamas de piel, uñas y pelos, éstas se trataron con KOH al 10% más tinte Parker 51 azul permanente y KOH al 10% adicionado de Chloroblack E (Burke & Jones, 1984).

El estudio también incluyó la observación y cultivo de levaduras en las muestras clínicas almacenadas. Para la observación microscópica de las células levaduriformes fue necesario dejar las preparaciones con KOH al 10% - Chloroblack en cámara húmeda por 24 horas, para una mejor observación.

Todas las muestras fueron sembradas en Agar Sabouraud dextrosado, Agar Lactrimiel (adicionados de cloranfenicol levógiro) e incubadas a 28° C por 15 días, antes de considerarlas negativas.

RESULTADOS

En la Tabla 1, se presentan los hallazgos en 33 muestras clínicas con un período de almacenamiento no inferior a 5 ni superior a 8 meses. El mayor número lo representan las muestras de uña (51,5%) y piel (42,4%).

Tabla 1.
Hongos previamente aislados en muestras control según localización

Especie	Uña		Piel		Pelo		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<i>T. rubrum</i>	10	30	10	30	0	0	20
<i>T. mentagrophytes</i>	2	6	2	6	0	0	4
<i>M. canis</i>	0	0	0	0	2	6	2
<i>E. floccosum</i>	0	0	1	3	0	0	1
<i>T. verrucosum</i>	3	9	1	3	0	0	4
<i>A. candidus</i>	2	6	0	0	0	0	2
Totales	17	51	14	42	2	6	33

En la Tabla 2, se aprecian los hallazgos al examen microscópico directo de hongos filamentosos y levaduriformes a partir de muestras almacenadas entre 1990-1994. El mayor número de positividad se obtuvo nuevamente en uñas con un 53,7% del total de las muestras (45% para hongos filamentosos y un 7,8% para los levaduriformes). La totalidad de los cultivos fue negativa en ambos medios.

En la Tabla 3, se presenta el tipo de muestra versus los hallazgos a microscopía directa y cultivo de las

muestras almacenadas entre 5-8 meses. A la microscopía, se observaron elementos fúngicos en el 100% de las muestras y en el 21,2% de ellas se aislaron: *Trubrum* (15,2%), *M. canis* (3%) y *Aspergillus candidus* (3%) (Tabla 4).

El mayor número de positividad en los cultivos se obtuvo en las muestras almacenadas durante 5 meses. Por sobre este tiempo se negativizaron, con excepción de una donde se aisló *Trubrum* en una muestra de 6 meses de antigüedad.

Tabla 2.
Examen directo de 257 muestras clínicas 1990 - 1994

Muestra	Hongos filamentosos				Hongos levaduriformes			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Uña	118	45	12	4,7	20	7,8	56	21,8
Piel	35	13,6	3	1,2	2	0,8	3	1,2
Pelo	8	3,1	0	0	0	0	0	0
Total	161	62,6	15	5,9	22	8,6	59	23

Tabla 3.
Presencia y viabilidad fúngica en las muestras utilizadas como controles (año 1996)

Muestra	Examen directo				Cultivo				Total %
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Uña	17	51,5	0	0	4	12,1	13	39,4	17
Piel	14	42,4	0	0	2	6,1	12	36,4	14
Pelo	2	6,1	0	0	1	3,0	1	3,0	2
Total	33	100	0	0	7	21,2	26	78,8	33

Tabla 4.
Hongos reaislados de muestras control según origen y tiempo de almacenaje

Aislamiento (Nº)	Origen	Tiempo Almacenaje	Nº cultivos Positivo		Nº cultivos Negativos		Total	% Especie aislada	
				%		%			%
<i>T. rubrum</i> (10)	Uña	5 : 6	3	9,1	7	21,2	10	30,3	9,1
(10)	Piel	5	2	6,1	8	24,2	10	30,3	6,1
<i>A. candidus</i> (2)	Uña	5	1	3,0	1	3,0	2	6,0	3,0
<i>M. canis</i> (2)	Pelo	5	1	3,0	1	3,0	2	6,0	3,0
Total			1	21,2	17	51,4	24	72,6	

DISCUSION

En los diagnósticos micológicos de las 257 muestras clínicas procesadas entre los periodos 1990-1994, los principales agentes de dermatomicosis, especialmente de adultos, fueron *T. rubrum* (39,7%) y *T. mentagrophytes* (16,5%). De los hongos levaduriformes, *C. albicans* (23,9%) fue el agente más importante en las onicomicosis con compromiso periungueal de la mano, lo que coincide con los estudios realizados por Zaror *et al.* (1982), López & Rivera (1984) y Canteros (1993).

El examen directo es esencial en el diagnóstico de una micosis, debido a que por medio de éste se establece en forma rápida y efectiva la presencia fúngica en la muestra, orientando al clínico acerca de la terapia a seguir (Ausina, 1982). Sin embargo, como este examen no permite discriminar hongos viables o no, el cultivo se hace indispensable.

En las publicaciones disponibles se registran estudios de viabilidad realizados principalmente en muestras de piel y pelos, que van de días a varios meses (Glass, 1948; Keep, 1960; Rosenthal & Vanbreuseghem, 1962, Dvórák & Hubalek, 1968). En nuestro estudio no se logró aislar ningún dermatofito debido al tiempo de almacenaje que fluctuó entre los 2 y 7 años, quizás demasiado tiempo para la sobrevivencia de las diversas estructuras fúngicas bajo condiciones ambientales adversas (pérdida de agua especialmente). Es posible que algunas de ellas pudieran mantenerse aún viables en tiempos inferiores a los 2 años, situación que no consideramos y que merecería posteriores estudios.

Keep (1960), publicó la viabilidad de tres cepas de *M. canis*, colectadas de tres casos separados de tiñas de gatos; el tiempo de almacenaje registrado fue de 315, 323 y 422 días.

Aunque los tiempos de almacenaje y las especies aisladas varían en los datos aportados por diferentes autores, todos concuerdan en la forma y las condiciones de almacenaje. En la literatura se registran reaislamientos en 20 meses de *T. verrucosum* en escamas de piel (Dvórák & Hubalek, 1968); después de 5 años de *T. violaceum*, *T. ferrugineum*, *T. verrucosum* y *T. kuryangei* (= *T. megninii*) en pelos (Rosenthal y Vanbreuseghem, 1962) y de *A. audouinii* y *M. lanosum* (= *M. canis*) en pelo después de 1214 y 1454 días respectivamente (Glass, 1948).

En las muestras controles almacenadas entre 5-8 meses, sólo hubo cultivos positivos de dermatofitos en un 21,2% y en general la sobrevivencia fúngica no sobrepasó los 5 meses. Estos resultados coinciden con los registrados por Dvórák y Hubalek (1968) para muestras de piel.

Keep (1960), hace mención de la importancia que tendrían los pelos de gato infectados, como reservorio de material infectado, pudiendo así contaminar el medio ambiente por al menos 13 meses, tiempo máximo de almacenaje de las muestras, en que logró reaislar el agente productor de la micosis.

M. canis, especie zooantropofílica, debería ser capaz de soportar mayores tiempos de almacenaje (superiores a 6 meses), por la producción de sus diversos propágulos infectantes, situación que no pudo comprobarse, quizás debido al reducido número de muestras control que lo contenían (2), así como en las muestras analizadas (9) y al amplio período de almacenaje.

La mayoría de las especies involucradas en nuestro estudio control, fueron capaces de soportar períodos de latencia de hasta 6 meses sin perder su viabilidad, demostrando así los alcances epidemiológicos de algunos dermatofitos u hongos oportunistas en muestras clínicas.

REFERENCIAS

- 1.- Ausina, R. V. (1982). Diagnóstico micológico de las dermatofitosis. En: J.M. Torres, R. (Ed.). Dermatofitos y dermatofitosis. Laboratorio Dr. Esteve S.A., Barcelona. pp. 85-95
- 2.- Burke, W. & Jones, B. (1984). A simple stain for rapid office diagnosis of fungus infection of the skin. Archives of Dermatology 120:1519-1520
- 3.- Canteros, C.E.; Davel, G.O.; Vivot, W.; D'Amico, S. (1993). Incidencia de los distintos agentes etiológicos de micosis superficiales. Rev. Arg. Micología 25:129-135
- 4.- Díaz, M.C.; Salamanca, L. & Piontelli, E. (1984). Dermatofitosis: Un problema del pasado, un desafío del presente. Adelantos en Microbiol. y Enf. Infec. 3:212-273
- 5.- Dvorak, J. & Hubalek, Z. (1968). Survival of the dermatophytes in human skin scales. Archives Dermatology 98:540-542
- 6.- Freeman, B.A. (1989). Micología Médica: Hongos y actinomicetos patógenos. En: Microbiología de Burrows 2a. edición. Editorial Interamericana pp. 1021-1030
- 7.- Glas, F. (1948). A viability of fungus in hairs from patients with Tinea capitis. Arch. of Dermatol. 57:122-124
- 8.- Keep, J.M. (1960). Tile viability of *Microsporum canis* on isolated cat hair. The Australian Vet. Journ. 36:277-278
- 9.- Koneman, E.W. & Glen, D.R. (1985). Identificación de laboratorio de mohos (hongos filamentosos). Micología práctica de Laboratorio 3a ed. Editorial Méd. Panam. Buenos Aires. pp. 122-128
- 10.- Kwon-Chung, K.J. & Bennet, J.E. (1992). Medical

Mycology: Edition Lea and Febiger, Philadelphia.

11.- **Larone, D.H.** (1995). Medically important fungi. A guide to identification. Third Edition A.S.M. Press, Washington D.C.

12.- **Lopez-Martinez, R. & Rivera Llona, M.** (1984). Investigación de dermatofitos en la piel sana de diversas regiones corporales. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 25:365-369

13.- **Negrón, P., Briz De Negrón, C.** (1984). Agentes oportunistas de micosis de las uñas. Rev. Arg. Micol. 7:2-4

14.- **Pereiro, M.** (1982). Importancia de los dermatofitos en patología humana y animal. En: J.M. Torres R. (Ed.) Dermatofitos y Dermatofitosis. Laboratorios Dr. Esteve S.A. Barcelona, pp.11-14

15.- **Rippon, J.** (1974). Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. W.B. Saunders Company Philadelphia.

16.- **Rosenthal, S. & Vanbreuseghem, R.** (1962). Viability of the dermatophytes in depilated hairs. Arch. Dermatol. 85:103-105

17.- **Zaror, L.; Casas, S.; Martín, R.; Thibot, J.; Fischman, O.** (1988). Dermatofitos en perros y gatos sanos en Valdivia, Chile. Arch. Med. Vet. 20:140-143

18.- **Zaror, L. & Frick, P.** (1980). Onicomicosis por *Scopulariopsis brevicaulis*. Rev. Med. Chile 108:721-723

19.- **Zaror, L.; Moreno, M.I. & Frick, P.** (1982). Micosis superficiales en Valdivia, Chile. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 24:205-209

20.- **Zaror, L.; Moreno, M.I.; Frick, P.; Negrón, N.** (1984). Micosis ungueales de tipo oportunista. Rev. Clin. Española 173:315-316