

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE FLUORESCENCIA DIRECTA EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS SUPERFICIALES.

Mariel G. Carballo, N. Andrea Rodríguez,
Nora B. Peralta, Elisa D. de Cabalier

Laboratorio de la 1° Cátedra de Dermatología, Facultad de Ciencias Médicas,
Hospital Nacional de Clínicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Resumen

Los materiales obtenidos por raspado de lesiones de pacientes con micosis superficiales y observados al Examen Microscópico Directo (EMD) en 40 x con OHK al 40 % y calor, resulta satisfactorio para la detección e identificación de los organismos infectantes basados en sus características morfológicas.

Este examen requiere habilidad y experiencia del operador debido a que los elementos micóticos no son característicos o se encuentran en muy baja concentración.

En este estudio realizamos la técnica de Fluorescencia Directa Blancocalcofluor conjuntamente con el EMD con OHK al 40% y calor.

Para ello se analizaron 100 muestras obtenidas por raspado de piel lampiña, pequeños y grandes pliegues y uñas (pies y manos).

Encontramos un porcentaje menor de EMD positivos (+) con OHK al 40 % y calor que con la técnica de Blancocalcofluor, (84% y 90 % respectivamente). En este último se observaron mayor cantidad de elementos fúngicos (hifas, macro y microconidias), visualizándose nítidamente las características morfológicas de estos elementos.

Palabras clave: micosis superficial, dermatofitos, Blancocalcofluor, fluorescencia directa para hongos.

Abstract

A Direct Microscopic Exam (DME)- in 40x with KOH at 40% and heat- applied on materials obtained by scraping from injuries on patients infected with superficial mycosis,

results effective in the detection and identification of infectious organisms based on their morphological features.

This exam requires the ability of an experienced medical professional due to the fact that the mycotic element are not typical or are found in very small amounts.

In this study we applied the calcofluor white and fluorescence technique together with the DME with KOH at 40% and heat.

In order to do it, 100 samples obtained by scraping from skin of small and big folds and nails from feets and hands, were analyzed. We found a lower percentage of positive (+) DME with KOH at 40% and heat, than with the calcofluor white and Fluorescence Technique, an 84% and 90% respectively.

Through the latter, a higher amount of elements with fungi (hifas, macro and microconidias) were observed, and it was possible to clearly see the morphological characteristics of these elements.

Key words: superficial mycosis, dermatofitos, calcofluor white Technique, direct fluorescence for fungi.

Introducción

Debido al aumento de la incidencia de patologías micóticas en pacientes inmunodeprimidos por: antibiótico terapia, transplantes, tratamientos oncológicos, diabetes, traumas extensos, portadores del virus HIV, etc; se hace necesaria la utilización de un método rápido y sensible para identificación de los posibles agentes causales de las mismas.

La técnica de Microscopía de Fluorescencia del Blancocalcofluor para la detección de hongos causantes de micosis, es un método fácil, útil y práctico para la visualización de las características morfológicas de los elementos fúngicos. [1]. El Blancocalcofluor, fluorocromo no específico, presenta afinidad por las uniones B de polisacáridos (quitina y celulosa) principales componentes de la pared celular de los hongos.[2].

Por tal motivo decidimos emplear esta técnica para detectar los agentes causales de micosis superficiales, tanto "in vivo" como "in vitro", en paralelo con la técnica tradicional de HOK al 40% y calor.

Material y Método

Se estudiaron 100 muestras provenientes de piel lisa, pliegues y faneras de pacientes que concurren al Consultorio Externo del Servicio de Dermatología del Hospital Nacional de Clínicas, de la Provincia de Córdoba, con diagnóstico presuntivo de micosis superficial.

Se incluyeron pacientes con micosis superficial causadas por dermatofitos y *Malassezia furfur*, sin tratamiento micótico previo, excluyéndose aquellos que presentaron micosis superficiales debido a levaduras.

De los pacientes que reunieron los criterios de inclusión se obtuvieron los siguientes datos:

- edad, sexo, ocupación, tiempo de evolución de las lesiones.

Las lesiones se observaron macroscópicamente y se procedió al raspado de las mismas para su procesamiento.

En todos y cada uno de los casos se realizó Examen Microscópico Directo (EMD) en 40 x con la técnica de OHK al 40 % y calor, de las muestras obtenidas por raspado en piel lisa, grandes y pequeños pliegues y uñas (pies y manos).

Conjuntamente se realizó EMD con la técnica de Blancocalcofluor, para lo cual se empleó lo siguiente: se preparó una solución de Blancocalcofluor (Sigma) 0.1 grs. y Azul de Evans (Sigma) 0.05 grs. en 100 cc de agua destilada. [2]

Al material de las lesiones se le agregó una gota de la solución anterior y una gota de OHK al 10 %, se lo colocó entre porta y cubreobjeto para su observación microscópica.

Los materiales procedentes de colonias de cultivos de hongos, fueron procesados con la misma solución. [4]

Todas las muestras fueron observadas al microscopio óptico de luz ultravioleta Olympus bH2 lámpara halógena con filtro excitado azul a 460 nm y un filtro barrera B 6-12 como para fluorescencia.

Los elementos fúngicos se observaron de color verde manzana, con fondo fluorescente rojizo más o menos intenso, según los casos.

Los cultivos fueron realizados en agar Lactrimel y agar Sabouraud glucosado suplementados con antibióticos como gentamicina 80 mgr/ml y ampicilina 100 mgr/ml. Se incubaron hasta 30 días a 28° C [7, 8 y 9].

Las hifas filamentosas (dermatofitos y no dermatofitos) se identificaron macro y microscópicamente, en tanto que *Malassezia furfur*, fue identificada sólo por sus características morfológicas observadas en el EMD. [fig. 1, 2, 3 y 4].

Resultados

De las 100 muestras observadas, el 80 % correspondió a dermatofitos y el 20% a *Malassezia furfur*.

Los dermatofitos aislados en medios de cultivos fueron tipificados morfológica y bioquímicamente como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporium canis*.

Todos los elementos fúngicos (hifas, macroconidias y conidias) presentaron un color verde manzana con fondo rojizo al observarse en microscopio de luz ultravioleta por la técnica del Blancocalcofluor.

Se obtuvieron el 90 % de resultados positivos (+) con la técnica de Blancocalcofluor en las muestras extraídas de los pacientes; siendo el porcentaje levemente inferior (84 %), en las muestras procesadas con OHK al 40 % y calor. [8, 9].



Figura 1: Escamas de piel con elementos de Malassezia furfur.

Figura 2: Escamas de piel con hifas de dermatofitos.

Figura 3: Escamas de uñas con elementos de hongos filamentosos no dermatofito.

Figura 4: Cultivo de Trichophyton mentagrophytes. (microconidias e hifas)

Los resultados obtenidos con la técnica de Blancocalcofluor fueron sensiblemente superiores ya que la afinidad que tiene el colorante por las uniones b de polisacáridos quitina y celulosa, principales componentes de la pared celular de los hongos, determinan mayor resolución óptica en la observación microscópica.

A la técnica de OHK al 40 % y calor, se la utilizó como aclarante de las muestras obtenidas de pacientes y esto reduciría la posibilidad de visualizar los elementos fúngicos al microscopio óptico.

Comentarios y Discusión

En el laboratorio de micología, la técnica más utilizada para microscopio directa (EMD) es el montaje con HOK al 40% y calor, sin embargo consume mucho tiempo y a veces falla, debido a la presencia de patologías inmunosupresoras, tratamientos previos con antimicóticos y errores de operatividad, (producción de artificios, por la acción del OHK sobre todo en muestras que contienen elevado porcentaje de proteínas, y debido a la falta de contraste entre los elementos micóticos y restos celulares y la poca concentración de elementos fúngicos en las muestras con micosis confirmada.[8].

La técnica de Blancocalcofluor, es un método útil para examinar muestras clínicas, provenientes de dermatomycosis, observándose claramente las características morfológicas de los elementos fúngicos, (tanto en el EMD, como en cultivos). [1,2,3 y 4].

Realizamos este estudio en paralelo con la técnica de HOK al 40% y calor, en el diagnóstico de micosis superficiales.

A diferencia de otros autores, como Rüchel, empleamos el fluorocromo directamente en las escamas, después de la adición a las mismas de HOK al 10% sin calentamiento.

Esto nos permitió aumentar la resolución óptica en el caso de las escamas provenientes de piel y uñas.

Las muestras obtenidas de los cultivos, fueron tratadas directamente con el fluorocromo siguiendo las indicaciones de la

técnica para Fluorescencia Directa explicada en materiales y métodos.

Este método ha adquirido gran importancia ya que permite obtener un rápido y certero diagnóstico para brindar al paciente un apropiado tratamiento.

Numerosos autores han empleado las mismas técnicas de Microscopía de Fluorescencia del Blancocalcofluor para estudios de hifas en micosis subcutáneas y sistémicas.

Como se mencionó más arriba, Rüchel realizó su experiencia en materiales obtenidos de micosis superficiales y actualmente lo realiza con ratones infectados con agentes causantes de micosis profundas, en materiales obtenidos por necropsias.[3,4,5 y 6].

Conclusiones

En conclusión, nuestro objetivo fue emplear y poner en evidencia las ventajas de la técnica de Fluorescencia Directa con Blancocalcofluor, para detectar los agentes causales de micosis superficiales, en materiales obtenidos tanto "in vivo" como "in vitro", comparativamente con la técnica tradicional de HOK al 40% y calor.

De acuerdo a nuestro trabajo, de las 100 muestras obtenidas de pacientes con diagnóstico de micosis superficiales, se obtuvo el 90% de resultados positivos (+) con la técnica de Blancocalcofluor, y 84% de resultados positivos (+) con HOK al 40% y calor.

De ello se deduce que es un método rápido, sencillo y de una mayor resolución óptica, requiriendo solamente como especial equipamiento, el microscopio de fluorescencia.

Bibliografía

1. Monheit E.J.; MD Cowan D.F.; MD Moore D.G PhD Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor White and Fluorescence Microscopy. Arch Pathol Lab Med – Vol: 108. 616 –618 August 1984.
2. Kwon–Chung, K.J. & Benett J.E. Medical Mycology p.118 Ed. Lea and Febiger Philadelphia – London 1992.

3. R.Rüchel and S.Margraf. Rapid microscopical diagnosis of deep – seated mycosis following maceration of fresh Specimens and Staining with optical brighteners. *Mycoses* 36, 239 – 242. 1993.
4. Darken M: Applications of fluorescent brighteners in biological techniques. *Science* 1961; 133: 1704 – 05.
5. Rippon, J.W. *Medical Mycology*, Philadelphia: W.B Saunders. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes, 3 rd edn. 1988.
6. Panu H. Hendolin, Lars Paulin, Pirkko Koukila – Kahkola, Veli – Jukka Anttila, Henrik Malmberg, Malcolm Richardson and Jukka Ylikaski. Panfungal PCR and Multiplex Liquefied Hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *Journal of clinical Microbiology* p 4186 – 4192 Nov. 2000.
7. Ramos, L.; Riconi, A. Bracalente, B. C. Uso del Blancophor (Fluorocromo) en la búsqueda de hongos en materiales de piel por microscopia directa. *Rev. Ibero Am. Micol.* 7: 107 – 110. 1990.
8. Chander, J.; Chakrabarti, A.; Sharma, A.; Saini, J.S.; Panigahi, D. Evaluation of calcofluor staining in the diagnosis of fungal corneal ulcer. *Mycosis* 36: 243 – 245. 1993.
9. Hegeage, G.J.; Harrington, D.J. Use of calcofluor white in clinical Mycology Lab. *Med.* 15: 109 – 115. 1994.

posado del presente trabajo fue estudiar los aspectos subcelulares de la invasión de las células intersticiales de ovarios de embrion de pollo cultivados con LH o hCG. Explantos de ovarios izquierdo (funcionante) y derecho (regresivo) de 14 embriones de pollo de 7, 11, 15 y 19 días de desarrollo *in ovo* de raza Cobb's White Rock fueron cultivados por separado durante 4 días en: 1- Medio básico (control): minimum essential medium (MEM-GIBCO) con 10% de suero fetal bovino. 2- Medio básico con el agregado de LH o hCG (problemas). Los ovarios fueron seccionados en trozos de 2 a 3 mm de diámetro, lo que permitió realizar aproximadamente 30 cultivos de cada ovario. Como tales, las características de las células intersticiales y la aparición de las fibras y terminaciones nerviosas observadas en los explantos de ambos ovarios 11 días cultivados durante cuatro días eran similares a los 15 días *in ovo*. Problemas: con LH o hCG las fibras y terminaciones nerviosas fueron observadas en el ovario derecho y la médula del ovario izquierdo de 7 días cultivados durante cuatro días, en íntimo contacto con las células intersticiales productoras de esteroides. El problema estudiado se correspondía con los 11 días de desarrollo *in ovo*. Estos hallazgos sugieren que la invasión de las ovarios ocurre simultánea por un mecanismo inducido por hipoflárico-hipoflárico y por otro local con la producción de factores neurotróficos modulada por LH.

Palabras clave: Ultraestructura – Células intersticiales: invasión – Ovario – Embrion-Pollo – *In vitro* – LH – hCG

of the present work was to study the subcellular aspects of interstitial cells invasion in chick embryo ovaries cultured with LH or hCG. Cobb's White Rock female chick embryos at 7, 11, 15 and 19 days of incubation *in ovo* were employed. Explants of the left and right ovaries were cultured separately for 4 days in: 1- Basic medium (control): minimum essential medium (MEM-GIBCO) + 10% fetal bovine serum. 2- Basic medium with added LH or hCG (problems). The cultures were processed to be studied ultrastructurally (TEM). Left and right ovary explants were fixed two hours at room temperature in Karnovsky's fixative. The tissues were then post-fixed in osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer for one hour and after a rinse in buffer were dehydrated in acetone; afterwards they were embedded in Araldite resin. Thick sections stained with 1% Toluidine blue were examined and photographed using a Zeiss Photo II microscope. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Siemens Elmiskop 101 electron microscope.

Controls: In both ovaries the isolated interstitial cells and the appearance of nerve fibers and nerve endings were observed in the explants of 11-day cultured during four days and in a similar way at the age of 15 days of *in ovo* development. **Problems:** With LH or hCG nerve fibers and nerve endings were observed both in the right gonad and in the medulla of the left ovary in close contact with the steroid-producing interstitial cells. Ultrastructurally, the interstitial cells are recognized by their typical organelles: SER, Golgi apparatus, mitochondria