

# Aislamiento y caracterización de cepas silvestres de *Sporothrix schenckii* e investigación de reactores a la Esporotricina

Miguel Angel Sánchez-Alemán,\* Javier Araiza,\* Alexandro Bonifaz\*\*

Recepción versión modificada: 4 de noviembre de 2004      aceptación: 28 de noviembre de 2004

## Resumen

Se llevó a cabo un estudio en la sierra sur de Oaxaca de aislamiento de cepas silvestres de *Sporothrix schenckii* a partir de muestras de tierra, así como investigación de reactores positivos a la intradermorreacción con Esporotricina. El estudio se llevó a cabo a partir de la recolección de muestras de tierra y su posterior procesamiento mediante métodos de dilución y aislamiento del hongo en medios habituales de cultivo de Sabouraud simple y Sabouraud con antibióticos (SS y SA). Las cepas presuntivas se sometieron a pruebas de dimorfismo, formación de melanina y comprobación de virulencia en animales. Se investigaron los reactores positivos a la Esporotricina L (Levaduriforme). Se identificaron tres cepas presuntivas por sus características reproductivas, formación de melanina y capacidad virulenta. En la comunidad se investigaron a 144 individuos dando positivos a la Esporotricina L el 6.25%. Se comprueba el aislamiento de cepas virulentas de *S. schenckii* a partir de la naturaleza (suelo) y se comprueba primocontacto con éste en un porcentaje de la población estudiada.

**Palabras clave:** *Sporothrix schenckii*, esporotricosis, aislamiento, Esporotricina.

## Introducción

La esporotricosis es una micosis subcutánea y excepcionalmente sistémica, causada por un hongo dimórfico denominado *Sporothrix schenckii*. Es un padecimiento de curso subagudo, que afecta primordialmente piel y linfáticos, en forma de lesiones gomosas.<sup>1</sup> Es una micosis cosmopolita, con predominio en algunos países como

## Summary

We conducted a study in the southern mountains of the Mexican State of Oaxaca that consisted of isolation of wild *Sporothrix schenckii* strains obtained from soil samples and investigation of positive reactors to skin test reaction with sporotrichin antigen. The study was conducted by means of recollection of soil samples and processing of these with dilution methods and fungal isolation in ordinary culture media Sabouraud simple Agar with and without antibiotics (SS, SA). Suspected strains underwent dimorfism, melanin formation, and virulence confirmation tests. Investigation of positive reactors to sporotrichin Y (yeast) was also conducted. Three supposed strains were identified due to their reproductive characteristics, melanin production, and virulence. In the community; 144 individuals were studied, of whom 6.25% were positive to sporotrichin. Isolation of virulent strains of *Sporothrix schenckii* from nature (soil) and primo-infection of a percentage of the studied population were confirmed.

**Key Words:** *Sporothrix schenckii*, sporotrichosis, isolation, sporotrichin.

Japón, Australia, México, Uruguay, Brasil, Colombia, Perú y Guatemala.<sup>2-4</sup> En nuestro País, este padecimiento ocupa el primer lugar de las micosis subcutáneas.<sup>2</sup> La esporotricosis podría presentarse en una mayor frecuencia, pero no se detecta debido posiblemente a un diagnóstico deficiente como el ocurrido en la epidemia de 1988 en EU, donde sólo 15% de los pacientes fueron prescritos correctamente después del reconocimiento inicial.<sup>5</sup>

\* Laboratorio de Micología Médica del Servicio de Dermatología, Hospital General de México OD.

\*\* Profesor y Jefe del Departamento de Micología, Servicio de Dermatología, Hospital General de México OD.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Alexandro Bonifaz. Zempoala 60-101, Narvarte 03020. México D.F. Correo electrónico: bonyalx@servidor.unam.mx

*S. schenckii* se encuentra en la naturaleza en suelos, pastos, plantas, y también se ha reportado su aislamiento de la naturaleza a partir de brotes epidémicos como en Transvaal<sup>6</sup> y Estados Unidos (EU),<sup>5,7</sup> así como en zonas endémicas de Uruguay<sup>8</sup> y Brasil.<sup>9</sup> No todas las cepas aisladas de *S. schenckii* son virulentas, una de las principales características asociadas a su patogenicidad es su dimorfismo.<sup>10</sup> La mayoría de los aislamientos reportadas en la literatura está relacionada con casos de esporotricosis, pero se desconoce lo que ocurre en regiones que cumplen con las condiciones ecológicas de humedad y altitud, pero que no hay reportes de esta enfermedad. El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar a *S. schenckii* de la naturaleza, en una región del sur de México que no es conocida por su endemicidad a la infección, así como la investigación de reactores positivos al antígeno intradérmico (Esporotricina).

## Material y métodos

### Aislamiento de la naturaleza

El presente estudio se llevó a cabo en la comunidad rural de Sta. María Quiérolani, en la sierra sur de Oaxaca, México, se tomaron 125 muestras de tierra de cultivo, y circundantes a las viviendas, las cuales se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Para el aislamiento se usó 1 g de tierra que se diluyó en 10 ml de agua estéril, se realizaron 10 diluciones seriadas del orden 1:10. Cada dilución se sembró en placas de SS y SA, incubándolas a 28°C durante 72 h. Se realizaron observaciones coloniales y microscópicas, éstas últimas con azul de lactofenol. Las colonias presuntivas de *S. schenckii* se sometieron a tres pruebas: dimorfismo, presencia de melanina e infección experimental en animales.

### Caracterización microbiológica de *S. schenckii*

1. Dimorfismo: las cepas presuntivas de *S. schenckii* y una cepa proveniente de un aislado clínico (CC-89998) se sembraron en Agar BHI a 37°C. Se realizaron pases sucesivos cada tercer día en BHI hasta que se observó el desarrollo de levaduras por parte de la cepa control.
2. Presencia de melanina: la cepa CC-89998 y las cepas presuntivas de *S. schenckii* se sembraron en Agar alpiste negro, peptona dextrosa Agar (PDA) y Agar amaranto a 28°C, a las 72 h se observaron las características microscópicas.
3. Virulencia en ratones: las levaduras a partir de la última placa de Agar BHI, se resembraron en caldo BHI a 37°C durante siete días. Posteriormente se centrifugó a 3000

rpm. durante 5 min y se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 5 ml de SSI y se repitió el proceso hasta completar tres lavados, para finalmente resuspender en 1 ml de SSI. Las levaduras se cuantificaron con cámara de Neubauer y se diluyeron hasta obtener una concentración de 10<sup>6</sup> levaduras/ml. Se inocularon 30 ratones Balb-c machos de 20-25g con 500 µl de la suspensión de levaduras por vía intratesticular (IT). Como control positivo se inoculó la cepa CC-89998 y como control negativo 1 ml de SSI. Los ratones se revisaron cada tercer día en busca de lesiones, se sacrificaron después de 45 días. Una alícuota de 500 µl de la suspensión de levaduras, con la que fueron inoculados los ratones, se sembró en SA.

### Reactores positivos a Esporotricina en la comunidad.

Por medio de un muestreo por conveniencia, las personas que aceptaron participar, previo consentimiento informado, se les aplicó intradérmicamente en el brazo izquierdo 0.1 ml de antígeno levaduriforme de *S. schenckii* (Esporotricina L) a una dilución de 1:4,000. Los resultados de la intradermoreacción (IDR) se interpretaron después de 48 h, considerándose positivos aquellos que presentaron una induración eritematosa igual o mayor de 5 mm.

## Resultados

### Aislamiento de la naturaleza

Se identificaron nueve géneros diferentes de hongos: *Acremonium sp*, *Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, *Beauveria sp*, *Fusarium sp*, *Paecilomyces sp*, *Penicillium sp*, y *Verticillium sp*. Tres cepas silvestres se identificaron de manera presuntiva como *Sporothrix spp*, (CS-001, CS-002 y CS-003). En el cuadro I se presentan las características coloniales y microscópicas de las cepas silvestres y de la cepa control positivo (CC-89998). (Figura 1)

### Caracterización microbiológica de *S. schenckii*.

1. Dimorfismo: la cepa CC-89998 proveniente de un aislado clínico, presentó levaduras y blastoconidias en el día 24 posterior a la siembra en BHI a 37°C. Las cepas silvestres CS-001 y CS-002 desarrollaron pequeñas levaduras y conservaron algunas hifas al día 24, en cambio, la cepa CS-003 no desarrolló desde el primer pase a los 3 días posteriores a la siembra inicial.
2. Compuestos melanoides: las cepas CS-001, CS-002 y CC-89998, presentaron una pigmentación

oscura en función del medio utilizado, negro en alpiste, verde en PDA y negro en amaranto. La cepa CS-003 no presentó pigmentación oscura, en Agar amaranto desarrolló una coloración gris que se tornó blanca con el tiempo. Las cepas CS-001, CS-002 y la CC-89998 desarrollaron conidias pigmentadas, no así la cepa CS-003.

- Modelos animales: las cepas CS-001, CS-002 y CC8999 desarrollaron lesiones testiculares en los ratones inoculados con presencia de levaduras de *S. schenckii*, la cepa CS-003 ocasionó orquitis y en los controles negativos no se observaron lesiones. Las lesiones originadas por las cepas CS-001, CS-002 y CC8999 desaparecieron entre los 40-45 días después de la inoculación. (Figura 2) La viabilidad de las levaduras inoculadas se comprobó, al desarrollarse colonias miceliales en SA. Las cepas CS-001 y CS-002 se consideran como *S. schenckii* por la transformación dimórfica. La cepa CS-003 no. Por tanto en este estudio solamente se confirma el aislamiento de dos cepas de *S. schenckii*.

Un resumen de las pruebas confirmatorias y de virulencia para *S. schenckii*, se presenta en el cuadro II.

*Reactores positivos a Esporotricina en la comunidad*

Se estudió un total de 144 personas, 62 hombres y 82 mujeres, de una comunidad de 800 habitantes aproximadamente. En nueve personas se detectó una reacción positiva a la Esporotricina, 6.25% de la muestra estudiada. En el cuadro III, tres se presenta la frecuencia de reactores positivos a la Esporotricina en función de las características sociodemográficas estudiadas. Las mujeres de la muestra tuvieron 2.8 veces más probabilidad de haber estado en contacto con *S. schenckii* que los hombres. Los menores de 15 años del estudio presentaron 5.5 veces más riesgo de ser positivos para la Esporotricina en comparación con las personas de 16 a 30, pero un riesgo aún mayor (8.0 veces) se detectó en la población de 31-60 años. Las personas que carecen de instrucción escolar presentaron 2.6 veces más riesgo de ser positivos a la Esporotricina que los individuos con algún grado de escolaridad. Los menores y las amas de casa tuvieron 2.9 veces más probabilidad de haber estado en contacto con *S. schenckii* en comparación de los estudiantes y campesinos. Al analizar los resultados por razones de momio, ninguna de las asociaciones encontradas en el estudio resultaron estadísticamente significativas.

**Cuadro I. Morfología de cepas silvestres de *S. schenckii***

Cepa	Morfología colonial			Morfología microscópica	
	Forma	Elevación	Color	Hifas	Conidias
<i>S. schenckii</i> CS-001	Radiada	Cóncava	Crema	Hialinas y septadas	Simpodiales y aisladas
CS-002	Radiada	Cóncava	Crema	Hialinas y septadas	Simpodiales y aisladas
Presuntiva CS-003	Radiada	Cóncava	Café	Zarcillos	Microconidias
Control CC-89998	Radiada	Cóncava	Crema	Hialinas y septadas	Simpodiales y aisladas

**Cuadro II. Caracterización microbiológica de *S. schenckii* aislado de la naturaleza**

Cepa	BHI	PDA		Amaranto		Alpiste		Ratones	
	37°C	Pig*	Col°	Pig*	Col°	Pig*	Col°	LT&	INT%
CS-001	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CS-002	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CS-003	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CC-89998	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\*Conidias pigmentadas. °Coloración oscura de las colonias (verde/PDA, negra/amaranto, negra/alpiste negro). &Lesiones Testiculares (con presencia de levaduras). %Inflamación Testicular.

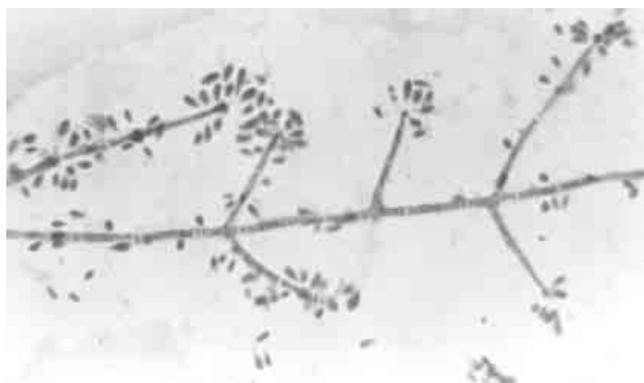


Figura 1. Micromorfología de *Sporothrix schenckii* (Eritrosina 60X).



Figura 2. Esporotricosis experimental. Forma diseminada.

## Discusión

La descripción colonial de las cepas CS-001 y CS-002, así como la morfología microscópica que identificó microconidias simpodiales y aisladas, fueron semejantes a la cepa control CC-89998 y a las características descritas por diversos autores,<sup>2,3,11</sup> además, la identificación de *S. schenckii* se confirmó con el dimorfismo termo/nutricional, al observarse formas levaduriformes en dos cepas silvestres.

Las características ecológicas de la comunidad rural donde se encontró a *S. schenckii*, como el clima (5-20°C), la alta humedad y la presencia de pinos y eucaliptos, son similares a las reportadas en otros aislamientos.<sup>12,13</sup> En México se han reportado aislamientos silvestres de *S. schenckii* en tres zonas donde se describieron casos clínicos de esta micosis y uno en zona endémica de Jalisco.<sup>15</sup> El presente trabajo es el primero en reportar el aislamiento de *S. schenckii* de la naturaleza en una región que no es conocida como endémica de esporotricosis, que sin embargo, cumple con las condiciones ecológicas para encontrar al hongo y posiblemente la enfermedad.

El aislamiento de *S. schenckii* no es suficiente para predecir la presencia de la infección en la población, es necesario, entre otros factores, que las cepas sean potencialmente patógenas. El dimorfismo termo/nutricional de *S. schenckii* es un factor de virulencia importante y selectivo, porque la rapidez con la que un hongo pasa de la forma micelial a la levaduriforme *in vivo* es determinante, debido a que las hifas son eliminadas más eficazmente por el organismo.<sup>11</sup> En el presente trabajo, las cepas silvestres CS-001 y CS-002 presentaron dimorfismo como un factor de virulencia, la cepa CS-003 no lo presentó, sin embargo, se sabe que no todas las cepas que por morfología colonial y microscópica son identificadas como *S. schenckii*, tienen la capacidad de crecer a 37°C.<sup>16</sup>

Las melaninas son compuestos bioquímicos que presentan diversos microorganismos, aunque no son esenciales para su desarrollo, son un factor de virulencia importante de muchos hongos patógenos.<sup>17,18</sup> Los compuestos melanoides se ponen de manifiesto en medios de cultivo como PDA y alpiste negro, observándose colonias con una pigmentación oscura, tal como las cepas silvestres CS-001 y CS-002, considerándose como un factor de virulencia importante, propio de cepas patógenas que pueden llegar a originar esporotricosis. El pigmento oscuro de *S. schenckii* sólo se encuentra en las conidias,<sup>19</sup> son estas estructuras infectivas las menos susceptibles a la luz UV, a la ionización y a la acción de radicales libres, además de presentar mayor resistencia a la fagocitosis.<sup>19</sup> Las conidias pigmentadas observadas en las cepas silvestres CS-001 y CS-002 son la presencia de compuestos melanoides y el dimorfismo, son factores

**Cuadro III.- Características sociodemográficas y reactores positivos a la Esporotricina**

Característica	Total	Pos (n) %
Sexo		
Mujer	82	(7) 8.5%
Hombre	62	(2) 3.2%
Edad*		
0-15	59	(5) 8.5%
16-30	60	(1) 1.7%
31-60	25	(3) 12.0%
Escolaridad		
Ninguna/Menor	36	(4) 11.1%
Alguna	108	(5) 4.6%
Ocupación		
Hogar	46	(5) 10.9%
Estudio de campo	98	(4) 4.1%

Pos= Positivos; n = número de casos.

de virulencia observados *in vitro* y la utilización de modelos animales pone de manifiesto la infección *in vivo*. Una investigación mostró que al inocular ratones subcutáneamente con aislados clínicos de *S. schenckii*, las lesiones aumentaron durante la primer semana, disminuyendo en la tercera para desaparecer después de seis semanas.<sup>20</sup> Estos resultados de aislados clínicos son semejantes a lo observado con las cepas CS-001 y CS-002 de aisladas de la naturaleza, las cuales después de la inoculación IT, provocaron lesiones que desaparecieron de los 40 a 45 días.

Dixon et al<sup>10</sup> encontraron que las cepas de *S. schenckii* que crecen a 37°C, productoras de colonias oscuras y conidias pigmentadas en Agar PDA, ocasionan una infección fatal en ratones inoculados por vía intravenosa. En Uruguay también se demostró la correlación entre la pigmentación de *S. schenckii* y la virulencia, al observarse orquitis en ratones inoculados IT y lesiones en cola y patas posterior a la inoculación IP.<sup>8</sup> Las cepas silvestres CS-001 y CS-002 así como la cepa control CC-89998, son semejantes a las cepas de aislados clínicos y patógenas silvestres reportadas por Dixon et al durante la epidemia estadounidense de esporotricosis.<sup>10</sup> Nuestro estudio demostró coloración oscura de las colonias, así como el dimorfismo a 37°C.

De la población estudiada 6.25% presentó inmunidad celular contra *S. schenckii*, con lo que se evidencia el contacto del hongo con la población. La dilución utilizada para la IDR fue 100 veces menor a la recomendada, para evitar posibles reacciones inespecíficas, por lo que el número de reactores positivos se incrementaría al usar las concentraciones habituales de Esporotricina.

La mayor frecuencia de reactores positivos a la Esporotricina fue en mujeres, que contrasta con los datos de la enfermedad en México, que muestran una frecuencia ligeramente mayor en los hombres, tanto del Centro Dermatológico Pascua<sup>21</sup> como de un estudio multicéntrico en Jalisco.<sup>22</sup> Investigaciones en otras partes del mundo mencionan a la mujer como más susceptible a la infección,<sup>23-25</sup> de manera similar a lo que se encontró en nuestro trabajo. El riesgo en los niños y adolescentes está de acuerdo a lo reportado en el Centro Dermatológico Pascua y el estudio de Jalisco,<sup>22</sup> donde muestran cierta preferencia de la esporotricosis por los menores de 15 años, tal como lo menciona también el reporte de Perú.<sup>4</sup> El mayor riesgo de haber estado en contacto con *S. schenckii* se detectó en los adultos (31-60 años) esto puede deberse a que la respuesta celular se mantiene positiva casi de por vida.<sup>21</sup>

La esporotricosis predomina en el nivel socioeconómico bajo, debido a su forma de adquisición.<sup>2,11</sup> El pueblo de Sta. María Quiérolani donde se realizó la investigación, se encuentra en el más bajo nivel de bienestar en función de la clasificación del Instituto Nacional de Estadística,

Geografía e Informática (INEGI),<sup>26</sup> sin embargo, al interior de la comunidad existen diferentes estratos sociales, siendo los más vulnerables aquellos que carecen de escolaridad, así como las amas de casa y los menores, coincidiendo con los reactores positivos a Esporotricina, que los coloca en un mayor riesgo de estar en contacto con el hongo y como consecuencia de adquirir la enfermedad.

Se lograron aislar dos cepas silvestres patógenas de *S. schenckii* en una región que no es reconocida por su alta frecuencia de esporotricosis, como el occidente y el centro del país.<sup>2</sup> También se comprobó el contacto *S. schenckii*-humano, al encontrarse 6.25% de reactores positivos a la Esporotricina. Por tanto, es factible que la esporotricosis se encuentre presente en esta comunidad de la sierra sur de Oaxaca, y en muchas otras comunidades rurales de México, mal diagnosticada y pasando inadvertida por el personal de salud.

**Agradecimientos:** A la M. en C. Gabriela Echaniz por los comentarios y asesoramiento para la realización de este trabajo.

## Referencias

1. **Kauffman C.** Sporotrichosis. Clin Infect Dis 1999;29:231-237.
2. **Arenas R.** Esporotricosis. En: Micología Médica Ilustrada. McGraw-Hill-Interamericana, México D.F., 2003;pp185-206.
3. **López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares R.** Esporotricosis. En: Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. Edit. Trillas. México D.F., 1995;pp 67-70.
4. **Pappas PG, Telez I, Deep AE, Nolasco D, et al.** Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hyperendemicity. Clin Inf Dis 2000;30:65-70.
5. **Coles BF, Schuchat A, Dixon DM, et al.** A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. Am J Epidemiol 1992;136:475-487.
6. **Findlay GH.** The epidemiology of sporotrichosis in the Transvaal. Sabouraudia 1970;7:231-236.
7. **Hajjeh R, McDonnell S, Reef S, et al.** Outbreak of sporotrichosis among three nursery workers. J Inf Dis, 1997;176:99-104.
8. **Mackinnon JE, Conti-Diaz IA, Gezeule E, et al.** Isolation of *sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. Sabouraudia, 1969;7:38-45.
9. **Rogers AL, Beneke ES.** Human pathogenic fungi recovered from Brazilian soil. Mycopath Mycol Appl 1964;22:15-20.
10. **Dixon DM, Duncan RA, Hurd NJ.** Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp* from de largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J Clin Microbiol 1992;30:951-954.
11. **Bonifaz A.** Esporotricosis En: Micología Médica Básica, Ed. Méndez-editores, México D.F., 2000;pp 185-206.
12. **Singh P, Sharma RC, Gupta ML, et al.** Sporotrichosis in Himachal Pradesh (India). Indian J Med Sci 1983;37:101-103.
13. **Vismer HF Eicker A.** Growth of human pathogenic isolates of *Sporothrix schenckii* on indigenous and exotic wood species in South Africa. Mycol Res 1994;98:121-124.
14. **Campos P, Arenas R, Coronado H.** Epidemic cutaneous sporotrichosis. Int J Dermatol 1994;33:38-41.
15. **Mayorga J, Martínez LD, Méndez GA.** Aislamiento de *Sporothrix schenckii* en la naturaleza (suelo y plantas). Med Cut Ibero Lat Amer 1999;27:25-28.
16. **Howard DH, Orr GF.** Comparison of strains of *Sporothrix schenckii* isolated from nature. J Bacteriol 1963;85:816-821.
17. **Dixon DM, Migliozzi J, Cooper Jr CR, et al.** Melanized and non-melanized multicellular form mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: mortality and histopathological studies. Mycoses 1992;35:17-21.
18. **Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Popkin TJ.** Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. J Bacteriol 1982;150:1414-1421.
19. **Romero-Martínez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, et al.** Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. Infect Immun 2000;68:3696-3703
20. **Lei PG, Yoshiike T, Yaguchi H, et al.** Histopathological studies of

- Sporothrix schenckii* -inoculated mice. Possible functions of polymorphonuclear leukocytes in normal and immunocompromised (congenitally athymic nude) mice. Mycopathologia 1993;122:89-93.
21. **Espinosa-Texis A.** Esporotricosis. Eepidemiología. En Actualidades en Micología Médica. IV Diplomado en Micología Médica. ed. Fac. Medicina UNAM. México D.F. 2002;pp177-186.
  22. **Mayorga J, Tarango MV, Barba Rubio J.** Esporotricosis 100 años después (1898-1998). Dermatol Rev Mex 1999;43:S22-29.
  23. **Cuadros RG, Vidotto V, Bruatto M.** Sporotrichosis in the metropolitan area of Cusco, Peru, and in its region, Mycoses 1991;33:231-240.
  24. **Kini S, Pal D, Kowshik R.** Sporotrichosis in India: first authentic case report from the north western region and critical literature review. J Med Vet Mycol 1986;24:289-295.
  25. **Muir DB, Pritchard RC.** *Sporothrix schenckii* incidence in the Sidney region. Austr J Dermatol 1984;25:27-28.
  26. [www.inegi.com.mx](http://www.inegi.com.mx)