
Polimorfismo fenotípico de cepas autóctonas de *Sporothrix schenckii*

HERTA VÉLEZ, LUCÍA SANTAMARÍA, MARÍA ELENA VARGAS,
FERNANDO MONTOYA

Se presentan los resultados macroscópicos, de asimilación de azúcares y de virulencia de 55 cepas de *Sporothrix schenckii* aisladas a partir de lesiones de pacientes con esporotricosis cutánea, que consultaron al laboratorio de micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia, y que fueron coleccionadas en el transcurso de 10 años.

La morfología macroscópica de las colonias y su pigmentación se evaluaron tanto en agar mycosel como en extracto de malta. La mayoría de las cepas en los dos medios presentaban colonias con 2 ó 3 colores diferentes. En mycosel 5 cepas (9.1%) fueron monocromáticas y éste fue el medio más estable para definir las características de pigmentación. El 85% de las cepas en mycosel fueron café claras, café oscuras, plisadas o plisadas y umbilicadas. Todas las cepas asimilaron D-glucosa, glicerol y D-xilosa en el sistema Api 20C y 25 cepas se clasificaron en 9 biotipos de asimilación de la A a la I. La mayoría de las cepas tanto pigmentadas como albinas, resultaron virulentas para ratones. En éstos predominaron los cuerpos en cigarro en forma de naveta y no se visualizaron cuerpos asteroides en los exudados testiculares. Se demuestra así la gran heterogeneidad fenotípica

de las cepas autóctonas de *S. schenckii*, se plantea la importancia de correlacionar estos hallazgos con los patrones de heterogeneidad genética informados por investigadores japoneses y quizás explicar por esta diversidad fenotípica y genotípica, el polimorfismo clínico de la enfermedad y establecer mapas de distribución de los diferentes biotipos o genotipos en Colombia y América Latina. Incluso el cruzar cepas distantes en su biotipo o genotipo podría facilitar la obtención de la forma de reproducción sexual del microorganismo.

PALABRAS CLAVE

SPOROTHRIX SCHENCKII
ESPOROTRICOSIS
POLIMORFISMO
ASIMILACIÓN
MORFOLOGÍA

LICENCIADA HERTA VÉLEZ ARANGO, Profesora Titular; LICENCIADA LUCÍA SANTAMARÍA DE URIBE, Profesora Asistente; LICENCIADA MARÍA ELENA VARGAS DE BETANCUR; DOCTOR FERNANDO MONTOYA MAYA, Profesor Titular; todos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

INTRODUCCIÓN

La esporotricosis es una enfermedad subaguda o crónica producida por el hifomiceto *S. schenckii*, hongo dimórfico de amplia distribución en la naturaleza. La entidad y el hongo fueron descritos por primera vez en 1890 por Schenck (1) y el nombre de *S. schenckii* fue propuesto por Hektoen y Perkins en 1900 (2).

Aunque se conoce bien la diversidad macroscópica y funcional del microorganismo (3), sólo se han publicado dos estudios sobre la misma. En 1962 Mariat y colaboradores (4) dieron a conocer sus observaciones sobre 10 cepas mejicanas y 3 europeas de *S. schenckii*; Dixon y colaboradores (5) en 1991 estudiaron 21 cepas de norteamérica.

En este trabajo se informan los resultados macroscópicos, de asimilación de azúcares y de virulencia de cepas de *S. schenckii* aisladas a partir de lesiones clínicas de pacientes con esporotricosis cutánea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 55 cepas de *S. schenckii*, aisladas de muestras de pacientes con esporotricosis cutánea, que consultaron al laboratorio de micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, en Medellín, Colombia. Estas cepas fueron almacenadas por 10 años y conservadas en medio de mycosel (BBL, Cockeysville, Md) a 4°C, con repiques mensuales. Se determinaron su morfología macroscópica, el comportamiento fisiológico y la virulencia.

Morfología macroscópica

Para la caracterización morfológica la siembra se hizo a partir de una suspensión de esporos que contenía 5×10^5 células/ml, tomadas de colonias en fase miceliar recién repicadas. El inóculo se realizó en medio de mycosel y en extracto de malta (Difco, Detroit, Mich.), con asa calibrada de 0.01 ml, en 4 sitios equidistantes. Se hizo la lectura luego de 20 días de incubación a temperatura ambiente; los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron el pigmento, el brillo y la textura de la superficie; de acuerdo al pigmento las cepas se clasificaron como mono o policromáticas y se anotó el color respectivo; en cuanto al brillo se consideraron como brillantes u

opacas; con relación a la textura se describieron como cerebriformes, crateriformes, plisadas, lanudas, umbilicadas y con coremio. No se tuvieron en cuenta las características microscópicas.

Comportamiento fisiológico

Se evaluó mediante la prueba de asimilación de azúcares o auxonograma, por el método de Api 20C utilizado para la identificación de levaduras. Para tal efecto las cepas se revirtieron a la fase de levadura en agar infusión de cerebro y corazón (BHI) a 37°C; luego de tres pases sucesivos se suspendieron las levaduras a una concentración de 5×10^6 células/ml, en tampón salino fosfato (PBS) estéril, pH 7.2. Se utilizó la metodología recomendada en el estuche, pero la lectura se realizó a las 96 horas. Para cada uno de los 19 azúcares se informó si fue o no asimilado y se establecieron patrones de asimilación.

Virulencia

Se evaluó por la respuesta inflamatoria desencadenada después de inocular 0.1 ml de una suspensión de 5×10^6 levaduras/ml, en el testículo de ratones BALB/c blancos. A los 20 días del inóculo se sacrificaron los animales y se evaluó el cuadro inflamatorio. La respuesta se catalogó como presente o ausente de acuerdo a los hallazgos macroscópicos de edema, exudado o fistulización. Mediante examen directo con agua glicerinada o con la coloración de Gram se anotó la presencia en los exudados de cuerpos en cigarro y su morfología (ovales, alargados o en naveta) y la de cuerpos asteroides. Se realizaron además cultivos de los exudados en mycosel para aislar el agente.

Análisis estadístico

Se analizaron las siguientes asociaciones: pigmentación-medio de cultivo, pigmentación-virulencia, textura superficial-medio de cultivo. La prueba de hipótesis se hizo mediante chi cuadrado con una confianza del 95%.

RESULTADOS

Es sorprendente el polimorfismo pigmentario que exhibe *S. schenckii*; las colonias, tanto en mycosel

como en extracto de malta, pueden ser blancas, café claras, café oscuras, grises o negras. Las coloraciones pueden ser homogéneas, en parches o en bandas. La intensidad de los colores fue más marcada en el extracto de malta y en él se observaron algunas colonias verdes. La mayoría de las cepas en los dos medios de cultivo presentaban colonias con 2 ó 3 colores diferentes. Cinco cepas (9.1%) fueron monocromáticas en mycosel y 10 (18.2%) en extracto de malta. En la tabla N° 1 se muestra la distribución de colores de las cepas monocromáticas.

TABLA N° 1

PIGMENTACIÓN DE CEPAS MONOCROMÁTICAS DE *S. SCHENCKII* EN DOS MEDIOS DE CULTIVO

Color	Medio de cultivo	
	Mycosel	Extracto de malta
Blanco	2	4
Café claro	-	2
Café oscuro	1	3
Gris	1	1
Negro	1	-

En el medio de mycosel el 72% de las cepas policromáticas presentó la asociación de colonias café claras y café oscuras. Hubo una mayor diversidad en el extracto de malta. En la tabla N° 2 se observan el brillo y la textura de las colonias.

TABLA N° 2

BRILLO Y TEXTURA DE LAS COLONIAS DE *S. SCHENCKII* EN DOS MEDIOS DE CULTIVO

Color	Medio de cultivo	
	Mycosel	Extracto de malta
Brillante	20	3
Opaca	35	52
Cerebriforme	6	2
Crateriforme	6	2
Coremio	7	8
Lanuda	10	15
Plisada	37	37
Umbilicada	32	25

El 44% de las cepas en mycosel y el 40% de las de extracto de malta fueron simultáneamente plisadas y umbilicadas.

El 85% de las cepas en mycosel fueron café claras o café oscuras y plisadas o plisadas y umbilicadas.

Entre 85 y 100% de las cepas asimilaron D-glucosa, glicerol, D-xilosa, N-acetil-D-glucosamina, xilitol, sorbitol y celobiosa. Entre 40 y 67% asimilaron trehalosa, D-galactosa, adonitol, L-arabinosa, maltosa y sacarosa y entre 1.8 y 13% asimilaron melezitosa, metil-D-glucósido, lactosa y rafinosa. Ninguna cepa asimiló inositol ni 2-D-cetogluconato. En 25 cepas pudimos establecer patrones comunes de asimilación y en 30 ello no fue posible. Con las cepas agrupables se conformaron 9 patrones de asimilación (biotipos) que catalogamos de la A a la I. En cinco cepas establecimos el biotipo A y el I en sólo dos. En la tabla N° 3 se observan los patrones de asimilación de los 19 azúcares utilizados por los biotipos correspondientes.

La pigmentación no se asoció con una mayor respuesta inflamatoria después de la inoculación intratesticular del microorganismo. Más del 80% de las cepas, sin importar su color, indujeron tal respuesta. En el 92.7% de los casos (51/55) se visualizó y cultivó el agente en los exudados. Los cuerpos en cigarro visualizados fueron predominantemente de morfología en naveta (46/51), alargados 3 y ovals 2. En el estudio en fresco y con la coloración de gram no se encontraron cuerpos asteroides.

DISCUSIÓN

El polimorfismo encontrado en este estudio coincide con los resultados de Mariat y colaboradores (4) quienes trabajaron igualmente con cepas almacenadas de origen clínico, en su mayoría de pacientes mejicanos. Estos hallazgos contrastan con los de Dixon y colaboradores (5) quienes, a partir de aislamientos primarios de pacientes norteamericanos, obtuvieron cepas homogéneas intensamente pigmentadas, lo que plantearía una posible diversidad de las cepas de acuerdo a su origen geográfico, dado que el mismo polimorfismo lo hemos observado en las cepas autóctonas de aislamientos primarios. Resultados similares a los de Mariat y colaboradores (4) se obtuvieron con relación a la morfología de los cuerpos en cigarro ya que predominaron las navetas, no se observaron cuerpos asteroides y hubo igual respuesta inflamatoria a la inoculación intratesticular.

TABLA Nº 3
PATRONES DE ASIMILACIÓN DE AZÚCARES
DE 9 BIOTIPOS DE *S. SCHENCKII*

AZÚCAR	BIOTIPO								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
2-CETOGLUCONATO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADONITOL	+	+	-	+	-	-	-	-	+
ARABINOSA	+	+	+	+	+	-	-	-	+
CELOBIOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GALACTOSA	+	+	+	+	-	-	-	-	+
GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLICEROL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INOSITOL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LACTOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MALTOSA	+	+	+	+	+	+	-	+	+
MELEZITOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
METIL-D-GLUCÓSIDO	-	-	-	-	-	-	-	-	+
N-ACETILGLUCOSAMINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RAFINOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SACAROSA	-	+	+	+	-	-	-	-	+
SORBITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSA	+	+	+	-	+	+	-	+	+
XILITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XILOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ asimila
- no asimila

Únicamente Mariat y colaboradores (4) informan resultados de auxonogramas. En su trabajo evalúan 11 azúcares, 8 de ellos estudiados también por nosotros: L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y glicerol. En dicho estudio todas las cepas asimilaron la D-glucosa, el glicerol, la D-xilosa, la D-galactosa y la maltosa. En éste asimilaron la D-glucosa, el glicerol y la D-xilosa. Se encuentra así una mayor diversidad en la asimilación de azúcares de las cepas colombianas evaluadas, que puede ser atribuible al mayor número de cepas analizadas o a diferencias fenotípicas intrínsecas.

Otros autores han estudiado el polimorfismo microscópico de este hongo (6) y desde 1988 los japoneses (7-8) han conformado 10-11 genotipos de *S. schenckii* mediante fragmentos de restricción de ADN mitocondrial. Estos genotipos han permitido

establecer patrones de distribución geográfica del microorganismo en el Japón; una sola cepa suramericana que se ha estudiado, se ubicó como genotipo 3. Sería interesante correlacionar nuestros hallazgos de biotipos de asimilación con los genotipos señalados y quizás estudiar la posibilidad de relacionar los biotipos o genotipos con las formas clínicas de la esporotricosis y la respuesta terapéutica. Incluso el cruzar cepas distantes en su biotipo o genotipo podría facilitar la obtención de la forma de reproducción sexual del *S. schenckii*.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación contó con el apoyo financiero del Sistema Universitario de Investigaciones de la Universidad de Antioquia.

correlation studies of phenotypic and genotypic variation with the clinical and geographical patterns of the disease.

SUMMARY

PHENOTYPIC POLIMORPHISM IN INDIGENOUS STRAINS OF *SPOROTHRIX SCHENCKII*

We studied macroscopic colony findings, sugar assimilation patterns and virulence of 55 *Sporothrix schenckii* strains obtained from patients with cutaneous sporotrichosis. They were collected during a 10-year period at the Mycology Laboratory, University of Antioquia, School of Medicine, Medellín, Colombia. Pigmentation types and macroscopic morphological characteristics were studied on mycosel agar and malt extract. In most cases 2 or 3 colony colors were present in both media. In mycosel agar only 5 strains (9.1%) were monochromatic. Pigmentation was very stable in that medium. Eighty five percent of the mycosel agar colonies were beige, brown, pleated or pleated and umbilicated. All strains assimilated D-glucosa, glycerol and D-xylosa. We established 9 patterns of assimilation (biotypes), from A to I in 25 strains. Both pigmented and albino strains were virulent for mice. We emphasize the diversity of our indigenous strains, and the importance of genotypic characterization and of the

BIBLIOGRAFÍA

1. SCHENCK RR. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotricha. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1898; 9: 286-290.
2. HEKTOEN L, PERKINS CF. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*, a new pathogenic fungus. *J Exp Med* 1900; 5: 77-89
3. MARIAT F. Saprophytic and parasitic morphology of pathogenic fungi. *Symp Soc Gen Microbiol* 1964; 14: 85-111.
4. MARIAT F, LAVALLE P, DESTOMBES P. Recherches sur la sporotrichose. Étude micologique et pouvoir pathogène de souches mexicaines de *Sporotrichum schenckii*. *Sabouraudia* 1962; 2: 60-79.
5. DIXON DM, SALKIN IF, DUNCAN RA, et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1106-1113.
6. FINDLAY GH, VISMER HF. Studies in sporotrichosis: fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments. *Mycopathologia* 1986; 96: 115-122.
7. SUZUKI K, KAWASAKI M, ISHIZAKI H. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. *Mycopathologia* 1988; 103: 147-151.
8. TAKEDA Y, KAWASAKI M, ISHIZAKI H. Phylogeny and molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Japan. *Mycopathologia* 1991; 116: 9-14.



ITALMEX
PRODUCTOS
CIENTIFICOS