

Artículo original

Evaluación morfológica y bioquímica de aislados clínicos de *Trichophyton* spp.

Hilmarys Rodríguez Rojas^a, Mireya Mendoza^{a*}, Doryanna Correa^b, Elsy Casares^a

^aLaboratorio de Micología, Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina. ^bDepartamento de Bacteriología, Hospital Vargas de Caracas, Venezuela.

Recibido 26 de junio de 2014; aceptado 25 de noviembre de 2014

Resumen: Debido al pleomorfismo y variabilidad macroscópica que presenta el género *Trichophyton*, los métodos de identificación basados exclusivamente en caracteres morfológicos no son suficientes para su clasificación. El objetivo fue evaluar las características morfológicas y bioquímicas de aislados clínicos identificados como *Trichophyton* spp. Se estudiaron 98 cultivos, identificados previamente por macro y micromorfología y se reevaluaron por: microcultivo en lámina, perforación del pelo *in vitro*, hidrólisis de urea y uso de agares *Trichophyton* y BCP-MS-G. El análisis morfológico y las pruebas de hidrólisis de urea y perforación del pelo arrojaron 51% *T. rubrum*, 24% *T. mentagrophytes*, 16,6% *T. interdigitale*, 7% *T. tonsurans* y 2% *Trichophyton* spp. La prueba de urea evidenció un error de 9,4%. La evaluación mediante el BCP-MS-G permitió diferenciar *T. rubrum* tipo A algodonoso de *T. interdigitale*, e identificar *Trichophyton* spp. como *T. rubrum* tipo B granular. La concordancia entre la evaluación previa y la reevaluación fue de un 70% y entre las pruebas morfofisiológicas y BCP-MS-G fue de 96%. Se detectó un 30% de sobrediagnóstico de *T. rubrum*. Se sugiere el empleo del medio BCP-MS-G para diferenciar *T. interdigitale* de *T. rubrum* tipo A y otros biotipos de *T. rubrum* tipo B.

Palabras clave: dermatofitos, *Trichophyton* spp., identificación, medio BCP-MS-G, agares *Trichophyton*.

Morphological and biochemical evaluation of clinical isolates of *Trichophyton* spp.

Abstract: Due to the pleomorphism and macroscopic variability of the *Trichophyton* genus, identification methods based solely on the morphological characteristics are insufficient for its classification. The objective was to evaluate the morphological and biochemical characteristics of clinical isolates of *Trichophyton* spp. The study included 98 isolates previously identified by macro and micromorphology that were reassessed by means of microculture sheet, *in vitro* hair perforation, urea hydrolysis and culture on *Trichophyton* and BCP-MS-G agars. For morphological analysis, urea hydrolysis tests and *in vitro* hair perforation results were: *T. rubrum* 51%, *T. mentagrophytes* 24%, *T. interdigitale* 16.6%, *T. tonsurans* 7% and *Trichophyton* spp. 2%. The urea hydrolysis test showed 9.4% error. Culture on the BCP-MS-G medium allowed to differentiate *T. rubrum* cottony A type from *T. interdigitale* and the identification of *Trichophyton* spp. as *T. rubrum* granular B type. The agreement between the previous assessment and reassessment was 70% and when morphophysiological and BCP-MS-G culture were considered, agreement reached 96%. There was 30% overdiagnosis for *T. rubrum*. Cultures on BCP-MS-G agar are suggested to differentiate *T. interdigitale* from *T. rubrum* A type and other biotypes of *T. rubrum* B type.

Keywords: dermatophytes, *Trichophyton* spp., identification, BCP-MS-G medium, *Trichophyton* agars.

* Correspondencia:
E-mail: marmont04@hotmail.com

Introducción

Los dermatofitos constituyen un grupo bien definido de hongos filamentosos taxonómicamente relacionados. Originan una variedad de lesiones clínicas llamadas dermatofitosis o *Tineas*. Los agentes etiológicos involucrados se clasifican en tres géneros anamorfos: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton* y uno teleomorfo, *Arthroderma*. [1]. De estos, el género *Trichophyton* ha aumentado su incidencia en los últimos

tiempos. En los años 40 se aislaba en un 23% de las dermatofitosis; para el 2006 fue el agente causal en un 80% de los casos [2-5]. El género se caracteriza por presentar colonias con diferencias y similitudes entre sus especies, empleándose convencionalmente para su identificación la observación de los caracteres macro y microscópicos de los cultivos, adicionalmente pruebas fisiológicas, y estudios más recientes sugieren pruebas moleculares [6-9]. La producción de pigmento, la actividad de la ureasa, la perforación del pelo y los patrones de crecimiento en

los medios de cultivo con tiamina y niacina, así como otros medios diferenciales para *Trichophyton*, constituyen herramientas para la identificación de las especies de este género [1]. Dentro de las especies de *Trichophyton*, la más aislada a nivel mundial es *Trichophyton rubrum*, la cual fue considerada como una simple morfoespecie. Hoy en día, estudios multigénicos han demostrado que los dermatofitos conforman un grupo taxonómicamente homogéneo, ya que tienen muy baja diversidad genética a pesar de su alta heterogeneidad morfológica, por lo que muchas especies constituyen un complejo de especies. En el género *Trichophyton* se ha demostrado que algunos biotipos, que eran considerados especies verdaderas, molecularmente son similares. Dentro del Complejo *T. rubrum* se han incluido dos especies antropofílicas anamorfas: *T. rubrum* y *T. violaceum*; se ha demostrado que la especie *T. raubitschekii* es sinónimo de *T. rubrum*, diferenciándose solo en su biotipo por la presencia de abundantes macroconidios y prueba de ureasa positiva a partir de los 7 días [8-11]. En Australia, Kaminski, en base a los caracteres morfológicos observados en diferentes medios y algunas pruebas bioquímicas, propuso la clasificación biotípica de los tipos algodonoso o suave y granular de las cepas de *T. rubrum* [12]. Otros autores también han referido la diferenciación mayoritaria de estos dos tipos morfológicos, describiendo a *T. rubrum* tipo A algodonoso, el cual no asimila urea ni perfora el pelo *in vitro*, y *T. rubrum* tipo B granular, que es urea positivo y perforación de pelo positiva a los 7 días (incluyendo a los sinónimos de *T. rubrum*: *T. raubitschekii*, *T. fluviumuniense*, *T. kanei* y *T. soudanense*) [13-14].

En cuanto al Complejo *T. mentagrophytes*, por estudios genéticos las cuatro variedades inicialmente descritas como *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* y *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* actualmente han sido modificadas y reconocidas como especies: *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* como *T. interdigitale*; *T. mentagrophytes* var. *erinacei* como *T. erinacei*; *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* como *T. quinckeanum* y *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* como *T. mentagrophytes* y *Trichophyton* spp. [1,11,15].

Por su parte, *T. rubrum* tipo A, con un biotipo algodonoso, es macroscópicamente similar a *T. interdigitale*. El tipo granular es biotípicamente análogo a *T. mentagrophytes* y *T. raubitschekii*; la diferenciación entre estos biotipos se puede realizar mediante pruebas morfológicas y fisiológicas como: perforación del pelo *in vitro*, hidrólisis de la urea, asimilación de aminoácidos y producción de pigmentos [6]. Un estudio de frecuencia de dermatofitosis realizado en Caracas, específicamente en el Instituto de Biomedicina, ha reportado a *T. rubrum* como la especie predominante [16], y hasta donde tenemos conocimiento, en nuestro país no hay trabajos publicados sobre la aplicación de los métodos fenotípicos antes mencionados para diferenciar las especies del género *Trichophyton*, siendo nuestro objetivo recopilar aislados del género *Trichophyton* obtenidos a partir de muestras clínicas procesadas en el Laboratorio de Micología

de dicho instituto, con el fin de caracterizarlas morfológica y bioquímicamente, para evidenciar la existencia o no de la diversidad de biotipos del género *Trichophyton* en nuestro medio.

Materiales y métodos

Muestra: Un total de 98 aislados identificados como *Trichophyton* spp. en el laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina, constituyeron la muestra de estudio. Los aislados se mantuvieron por subcultivos en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) con cloranfenicol y medio de Lactrimel a temperatura ambiente. Los 98 aislados del estudio se identificaron previamente por evaluación macroscópica del cultivo en medio de Lactrimel y microscópicamente empleando el método de impronta con cinta adhesiva y el colorante de azul lacfofenol.

Cepas de referencia: Como cepas de referencia se incluyeron 9 especies diferentes de *Trichophyton* donadas por el Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (*T. rubrum*: D-412000-45, D-412000-47, D-412000-52; *T. mentagrophytes*: D-412000-11, D-412000-12, D-412000-13; *T. tonsurans*: 30564, 36995, 39297), y un segundo grupo de 8 cepas donadas gentilmente por la Dra. Mirtha Arango de la Universidad de Antioquia, Colombia (*T. rubrum*: 010020565, 010010821, 010020840; *T. mentagrophytes*: 010017996, 010015867, 010020332, 010018631, 010014716).

Ensayos para reevaluación de los aislados identificados como *Trichophyton*: Las 17 cepas de referencia y los 98 aislados del estudio fueron sometidos a iguales condiciones de análisis con el fin de establecer con las cepas control, el sistema de referencia para los análisis comparativos.

Morfología macroscópica: Los aislados se sembraron en medio ASD con cloranfenicol y en medio Lactrimel y se incubaron a temperatura ambiente por 7-12 días. Los cultivos fueron evaluados en cuanto al aspecto, textura y pigmentación del anverso y reverso de la colonia [13].

Morfología microscópica: Se empleó la técnica de microcultivo en lámina siguiendo el método de Riddel modificado [14]. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios: 1) ausencia o presencia de microconidios por campos observados: escasos (+) de 1-10, moderados (++) de 10-20 y abundantes (+++) > de 20 por campos observados; 2) presencia de macroconidios, 3) de clamidosporas y 4) de hifas en espiral [13,17].

Perforación del pelo *in vitro*: La técnica utilizada fue descrita por Allejo y Georg en 1957 [18]. En placas de Petri estériles se dispensaron segmentos de cabellos estériles y se procedió a la siembra del hongo, incubándose a temperatura del ambiente (entre 25 y 27 °C). A los 15-20 días se examinaron los pelos al microscopio, según lo descrito [17,18].

Producción de ureasa: Fue estudiada en caldo de urea (Oxoid) por el método de Christensen, incubándose a 27

°C con observación diaria por 12 días; las cepas ureasa positivas hacen virar en 2 a 3 días el indicador de pH del medio [17].

Crecimiento en el medio púrpura de bromocresol (BCP-MS-G): Fue preparado según la técnica propuesta por Fischer y Kane [19]. Cada uno de los aislados fue inoculado en el medio contenido en placas de Petri, incubándose por 7 días a 27 °C. Los aislados de *T. tonsurans* se sometieron a temperatura de 37 °C. Se examinaron los cambios de pH y las características de crecimiento de los aislamientos. El cambio de color de azul pálido a violeta púrpura indica una reacción alcalina positiva. En cuanto a la extensión de crecimiento de la colonia, se consideró como crecimiento restringido a las colonias con un radio de crecimiento menor a 10 mm [20].

Asimilación de aminoácidos: Vitaminas y aminoácidos necesarios para el crecimiento de las diferentes especies del género *Trichophyton*; estos están disponibles en los agares *Trichophyton* (Difco™, Becton Dickinson) T1, T2, T3, T4, T5, T6 y T7 [17]. Se emplearon cultivos frescos de 7-12 días en medio ASD que posteriormente fueron sembrados en los diferentes agares *Trichophyton*, transfiriendo una pequeña porción de la colonia (1 mm) y evitando la transferencia de ASD. Las placas se incubaron a 27 °C por 1 semana, con observación diaria. La extensión del crecimiento de los hongos se comparó entre sí [17,21]. La proporción mínima de crecimiento considerada fue de 1+ (> de 11mm) y de 4+ para el crecimiento más extenso.

Análisis estadístico: Se realizó mediante estadística descriptiva y comparativa. Se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS versión 10.0 y Epi info versión 3.5.1. Se efectuó una comparación entre las frecuencias observadas con las esperadas mediante la prueba de Chi cuadrado; se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$. En el caso de comparación de resultados obtenidos por diferentes técnicas o evaluadores, se aplicó la prueba del índice Kappa, para verificar el porcentaje de concordancia [22,23].

Las medidas de referencia se fundamentaron en las mediciones obtenidas con las cepas controles, tomándose para el cálculo del error absoluto y relativo las medidas de las cepas de referencia en relación a las obtenidas de los aislados reevaluados.

Los análisis comparativos se llevaron a cabo entre los resultados previos de diagnóstico morfológico y los resultados de la reevaluación de los aislados de *Trichophyton* spp.

Resultados

De los 98 aislados en estudio, previamente identificados en el laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina, por observación macro y microscópica del cultivo como *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale* y *T. tonsurans*, se reevaluó la identificación en una primera fase mediante análisis morfológico, hidrólisis de urea y capacidad de

perforación de pelo *in vitro*, lo cual permitió obtener los siguientes resultados: perforación del pelo: 51% (n=50) de *T. rubrum* negativo; 23% (n=23) positiva de *T. mentagrophytes*; 17% (n=16) positiva de *T. interdigitale* y 7% (n=7) negativa de *T. tonsurans*. Los *T. mentagrophytes* y los *T. interdigitale* mostraron perforación del pelo positiva a las dos semanas. Dos aislados fueron reportados como *Trichophyton* spp. debido a que las pruebas aplicadas no fueron suficientes para conocer con mayor precisión el tipo de especie. Un bajo porcentaje (13%) de *T. rubrum* dio positiva la urea en rangos de tiempo diferentes, entre 3 a más de 12 días; el 86,9% de los *T. mentagrophytes* hidrolizaron la urea entre 3 a 5 días. El 75% de los *T. interdigitale* resultó urea positivo a los 8 días. Los 2 casos reportados como *Trichophyton* spp. desdoblaron la urea a los 8 días (Tabla 1). De acuerdo a los datos expuestos, en relación a las cepas controles, la prueba arrojó un 9,4% de error relativo y un intervalo de confianza entre 4,4 a 17,0% debido a los posibles falsos positivos. El 100% de los *Trichophyton* clasificados como *T. rubrum* tipo A estudiados con la prueba de perforación del pelo dio negativa la prueba al finalizar las cuatro semanas, así como los identificados como *T. tonsurans*. La prueba de perforación del pelo presentó un porcentaje de error de 0% y un intervalo de confianza de 0,0 a 3,8%. Al comparar la prueba de ureasa con la de perforación del pelo, se observó una diferencia estadísticamente significativa de $p=0,0016$, siendo el método de perforación del pelo el más certero para la diferenciación entre las especies positivas y negativas (Tabla 1). En el medio BCP-MS-G, la mayoría de los aislamientos de *T. rubrum* producen un intenso pigmento color vino tinto al reverso de la colonia, mientras que las colonias de *T. mentagrophytes* muestran pigmentación que va desde incolora a rojiza. Los aislados de *T. rubrum* mostraron un crecimiento limitado y no produjeron reacción alcalina, mientras que *T. mentagrophytes* y *T. interdigitale* mostraron un crecimiento profuso y reacciones alcalinas. El medio BCP-MG-S permitió clasificar los *Trichophyton* spp. como *T. rubrum* tipo B granular, mostrando crecimiento restringido sin viraje de pH y pigmento vino intenso, características propias de esta variedad. Finalmente, se obtuvo un 53% de *T. rubrum*, debido a que al porcentaje obtenido por morfología y análisis fisiológico se le adicionó el de las variedades granulares. Se mantuvo igual número y porcentaje de *T. mentagrophytes* (23%), y 17% de *T. interdigitale*. Una colonia, que inicialmente fue descrita como *T. rubrum*, presentó aspecto macroscópico granular. Al estudio microscópico se observaron abundantes macroconidios de pared delgada en forma de cigarro, prueba de urea positiva a las dos semanas y perforación del pelo positiva. El error de esta prueba fue 0%, siendo notablemente específica, y en conjunto con la morfología, sugiere la presencia del biotipo de *T. rhodainii* (Figura 1). Actualmente, este biotipo, al igual que *T. raubistcheckii*, es considerado genéticamente un sinónimo de *T. rubrum*. El 95,8% de los aislados analizados crecieron de forma difusa en el agar *Trichophyton*, con un rango de crecimiento entre 2 cruces (++) a 3 cruces (+++), lo que indicó que los

Tabla 1. Distribución de los aislados de *Trichophyton* spp. evaluados mediante asimilación de urea y perforación del pelo *in vitro*.

Urea (días)	<i>T. rubrum</i> n (%)	<i>T. mentagrophytes</i> n (%)	<i>T. interdigitale</i> n (%)	<i>T. tonsurans</i> n (%)	<i>Trichophyton</i> sp n (%)	Total
Neg -	43 (86)	1 (4,3)	1 (6,3)	0	0	45
Pos + 3-5 d	5 (10)	20 (86,9)	1 (6,3)	7 (100)	0	33
Pos + 7 d	0	2 (8,6)	2 (12,5)	0	0	4
Pos + 8 d	1 (2)	0	12 (75)	0	2 (100)	15
Pos + 12 d	1(1)	0	0	0	0	1
Total	50 (100)	23 (100)	16 (100)	7 (100)	2 (100)	98
PP Pos +	0	23%	16%	0	2%	41 (41,8)
PP Neg -	50 (100)	0	0	76 (100)	0	57 (58,1)
Total	50 (100)	23 (100)	16 (100)	6 (100)	2	98

PP (Prueba de perforación del pelo), Pos + (positivo), Neg – (negativo) n: numero de aislados.

mencionados aislados no necesitaron de requerimientos nutritivos especiales para su desarrollo. Al comparar, mediante el índice Kappa, los resultados obtenidos por análisis morfológico, urea y perforación del pelo, con los arrojados por el laboratorio de Micología, se obtuvieron 69 aislados en los que hubo analogía entre la metodología por diagnóstico morfológico aplicada por el laboratorio y la realizada por esta evaluación, lo que representó un 70,4% de concordancia. Específicamente, en el caso de *T. interdigitale*, el laboratorio identificó 5 aislados, y en este estudio se verificaron 16 aislados, es decir, 11 *T. interdigitale* fueron identificados erróneamente como *T. rubrum*, lo que se traduce en un 30% de sobre diagnóstico de *T. rubrum* (Tabla 2). Entre el estudio morfológico y el obtenido utilizando el medio BCP-MS-G se alcanzó un 96,9% de concordancia.

El diagnóstico de *Trichophyton* spp. con agares comerciales *Trichophyton*, no mostró requerimientos especiales de los aislados estudiados.

Las cepas controles enviadas por la Dra. Mirtha Arango de la Universidad de Antioquia de Colombia habían sido

previamente identificadas por estudio macroscópico en ASD, micromorfología y agares *Trichophyton*. En la reevaluación realizada, los resultados concordaron en un 100% con los descritos por la Dra. Arango y los del Instituto Nacional de Higiene, al igual que para el resto de las pruebas ensayadas.

Tabla 2. Comparación de los resultados emitidos por el laboratorio de Micología y los obtenidos mediante análisis morfológico y fisiológico.

Resultados emitidos por el laboratorio de Micología (Morfología)	Resultados obtenidos mediante evaluación: morfológica – urea – perforación del pelo					Total
	<i>T.i</i>	<i>T.m</i>	<i>T.r</i>	<i>T.t</i>	<i>T.sp</i>	
<i>T. interdigitale</i>	2	0	3	0	0	5
<i>T. mentagrophytes</i>	4	15	0	0	1	20
<i>T. rubrum</i>	9	5	47	2	1	64
<i>T. tonsurans</i>	1	3	0	5	0	9
<i>Trichophyton</i> sp.		0	0	0	0	0
Total	16	23	50	7	2	98

T.i: *Trichophyton interdigitale*; *T.m*: *T. mentagrophytes*; *T.r*: *T. rubrum*; *T.t*: *T. tonsurans*. *T.sp*: *Trichophyton* sp.

Discusión

Se han realizado estudios sobre la identificación del género *Trichophyton*: en 1985, Medero y col. [16], analizaron 56 cepas de *T. rubrum*, las cuales resultaron de la variedad algodonosa; para el año 2004, un estudio realizado en el Centro de Investigaciones “José Witremundo Torrealba” de la Universidad de los Andes, por análisis micro y macroscópico, reveló que el 55% de las cepas aisladas correspondían a *T. rubrum* seguido de *T. mentagrophytes* [24]. Para el periodo 2009-2010, el laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina identificó 140 cultivos como *Trichophyton* spp. en función del estudio macro y microscópico de las colonias (datos no publicados); en este estudio se reevaluaron 98 de estos aislados, con la

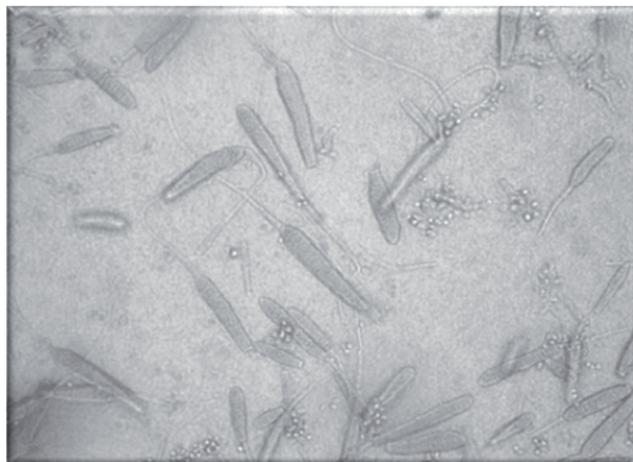


Figura 1. *Trichophyton rubrum* tipo B granular. Extendido del cultivo en azul lactofenol, 40x . Leica v3, 3.0.

adición de pruebas fisiológicas y bioquímicas. Usualmente, la identificación de los dermatofitos se basa en el análisis de las características fenotípicas macro y microscópicas de las colonias. Sin embargo, estos criterios pueden ser insuficientes, por la tendencia al pleomorfismo de las colonias y debido a que las características de las mismas pueden variar dentro de un taxón o ser similares entre sí, especialmente en los aislados de *Trichophyton* spp., por lo que las pruebas fisiológicas podrían ser necesarias para la correcta identificación [20].

En nuestro estudio, la evaluación macroscópica de las colonias de *T. rubrum* en ASD, evidenció un 96% (n=50) de la variedad algodonosa, en su mayoría con centro amarillo y borde color vino, y el 76% (n= 36) presentó escasos microconidios piriformes y en algunos casos no se evidenciaron. Las características macroscópicas fueron similares a las reportadas como *T. interdigitale*, sin embargo, aun cuando esta especie presenta microconidios piriformes alternos, se verificó que los mismos están presentes en mayor proporción; además, en algunos casos se observaron microconidios redondos y macroconidios e hifas en espiral, estas últimas en menor proporción que las observadas en *T. mentagrophytes*. Yusel *et al.* [25], encontraron que el 63% de las cepas de *T. mentagrophytes* formaron macroconidios en agar Lactrimel y el 25% en agar Sabouraud glucosa. En nuestro estudio el 74% (n=17) de un total de 23 aislados de *T. mentagrophytes* desarrollaron macroconidios en medio Lactrimel. Por su parte, Guoling *et al.* [26], señalaron que *T. rubrum* mostró un alto grado de diversidad morfológica, incluyendo la presencia o ausencia de micro y macroconidios, la pigmentación roja de la colonia y la actividad ureasa. Graser *et al.* [27], observaron una asociación entre las características morfológicas y los genotipos en dos poblaciones de *T. rubrum* y *T. violaceum*, donde la población de *T. rubrum* fue dominada por cepas que no producían ureasa y carecían de hifas fructíferas (97%); sin embargo, la ureasa se expresó en las cepas de ambas poblaciones, con o sin la presencia de hifas reproductivas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, donde 87% (n=43) de los aislados de *T. rubrum* variedad algodonosa no asimilaban la urea; un 13% de dicha especie (n=7), presentó ureasa en un rango de tiempo de 3 a 12 días, lo que se podría correlacionar en nuestro caso con un error de 9,4% y un límite de confianza de 4,4 a 17,0%. Los hallazgos de Tartabini *et al.* [1], en cuanto a la determinación de ureasa en *T. rubrum*, señalaron un 27,5% de positividad.

Otros investigadores evaluaron la hidrólisis de urea y encontraron que el 75% de las cepas de *T. mentagrophytes* fueron ureasa positivas en 10 días, 5% en 20 días, y el 20% fueron negativas [28]. En nuestro estudio, de un total de 23 aislados de *T. mentagrophytes*, 87% (n=20) resultaron urea positivos entre 3 y 5 días; uno de los aislados resultó urea negativo. Un 4% de negatividad a la prueba de urea en esta especie también ha sido reportado [1]. De 16 *T. interdigitale*, el 75% (n=12) resultó caldo urea positivos a los 8 días, al igual que *T. mentagrophytes*; uno de ellos

resultó urea negativa (6,2%). Fischer *et al.* [19], señalaron que el medio caldo de urea es preferible a los medios de agar base, ya que es más sensible. También se ha descrito la actividad ureasa de cepas de *T. erinacei* (antigua variedad de *T. mentagrophytes*) de Japón, Kenia, Europa y Nueva Zelanda, demostrando variabilidad en los resultados, llegando a la conclusión de que dicha prueba presenta una mayor probabilidad de error, lo cual no la hace tan confiable para el diagnóstico de los biotipos del género *Trichophyton*, observándose que la prueba más fiable para diferenciar *T. mentagrophytes* de *T. rubrum* fue la de perforación del pelo *in vitro*, con un coeficiente de determinación de 1.000 y 1% de falsos positivos [28,29]. En nuestro estudio esto se corroboró, ya que la prueba de perforación del pelo no arrojó error relativo y el límite de confianza fue de 0,0 a 3,8 %.

Summerbell *et al.* [20], señalaron que los aislados de *T. mentagrophytes* estudiados por ellos, en diferentes pruebas mostraron crecimiento difuso con una reacción alcalina visible a los 7 días en el BCP-MS-G, una fuerte actividad de ureasa y perforación del pelo, hecho que concordó con nuestra evaluación. Por otra parte, las cepas de *T. rubrum* de nuestro estudio fueron ureasa negativo y no perforaron el pelo, excepto las dos variedades granulares encontradas; dos casos con perforación del pelo positivo en *T. rubrum* también fueron referidos por Tartabini *et al.* [1]; las variedades algodonosas no produjeron alcalinidad en el BCP-MS-G después de 7 días y tuvieron crecimiento restringido con producción de pigmento vino intenso [28]. En nuestro estudio se encontró una concordancia de 96,9% entre la evaluación macroscópica de las colonias, la asimilación de urea, perforación del pelo y BCP-MS-G, y una concordancia del 70% entre el diagnóstico morfológico realizado por el laboratorio de Micología y la reevaluación de este estudio. Sin embargo, es necesario resaltar que el 30% restante se debió al sobrediagnóstico de *T. rubrum* que, según la evaluación realizada en el medio BCP-MS-G, resultó ser *T. interdigitale*, por lo que en este estudio, el uso del medio BCP-MS-G fue de gran importancia en la diferenciación de *T. rubrum* y *T. interdigitale*. Otros autores también han recomendado el empleo de este medio para la diferenciación fenotípica de *T. rubrum* del Complejo *T. mentagrophytes* [1].

Como ya fue mencionado, los estudios genotípicos describen que el Complejo *T. rubrum* comprende dos especies: *T. rubrum* y *T. violaceum*, siendo el resto de las especies consideradas sinónimos, aunque biotípicamente presenten diferencias. En nuestro estudio, las dos colonias de *T. rubrum* tipo B (granular), fueron similares biotípicamente a la antes nombrada variedad granular *rhodainii* y/o *africana*, sin embargo, una de ellas también mostró semejanza con la variedad *raubitschekii*, por la asimilación de urea y las características macro y microscópicas. Gómez y col. [30] diagnosticaron en España variedades emergentes de *T. rubrum* var. *raubitschekii* productoras de *Tinea glutealis*, en la cual observaron abundantes macroconidios que germinaban a través de la celda terminal, produciendo

apéndices a modo de cola de ratón, similares a lo observado en este estudio (Figura 1). Cabe mencionar que estos biotipos son raramente descritos como agente causal de dermatomycosis, y hasta donde conocemos, tampoco han sido descritos en Venezuela.

En este trabajo se pudo evidenciar que las pruebas morfológicas y fisiológicas por sí solas, presentan un margen de inespecificidad, aun cuando el medio BCP-MS-G contribuyó notoriamente con la evaluación de las especies descritas.

Debido a la elevada concordancia encontrada con el medio BCP-MS-G (96%), se sugiere implementar su uso de forma rutinaria en los laboratorios de Micología, ya que el diagnóstico morfológico de los dermatofitos, especialmente del género *Trichophyton*, es difícil debido a su tendencia al pleomorfismo. La implementación de métodos fenotípicos, como la perforación del pelo y el medio BCP-MS-G, en conjunto con la morfología, podrían facilitar la diferenciación de *T. rubrum* de *T. interdigitale*, así como la detección de las especies de *T. rubrum* tipo B granular.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

A la Dra. Mirtha Arango de la Universidad de Antioquia-Colombia y la MSc. María Mercedes Panizo del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas-Venezuela, por la diligente y gentil donación de las cepas de referencia empleadas en este estudio.

Referencias

- Tartabini ML, Bonino GS, Racca L, Luque AG. Estudio taxonómico de aislamientos clínicos de *Trichophyton* en Rosario, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2013; 45:248-53.
- Angulo A, Bravo N, Falco, Pulido M, Rivera Z, Cavallera E. Dermatomycosis por *Trichophyton rubrum*: experiencia de 10 años en el Departamento de Micología del Instituto de Biomedicina -Venezuela. *Rev Dermat Ven.* 2008; 46:12-7.
- Ballesté R, Barloco A, Petruchelli S, Perelló G. Frecuencia de especies de *Trichophyton* en dermatomycosis diagnosticadas en el Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela, Uruguay. *Rev Urug Patol Clín.* 2006; 20:10-24.
- Cabezas C, Parcha C, Pineda J, Reyes E. Estandarización de una técnica de amplificación genómica (PCR) para el diagnóstico de dermatofitos. *Cienc Trab.* 2006; 8:167-71.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL. Koneman. Diagnóstico Microbiológico. 6^{ta} edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2008.
- Conti Díaz I. Micosis superficiales. *Rev Biomedicina.* 2006; 2:13-33.
- Hernández A, Carbajal P, Fernández R, Arenas R. Dermatomycosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24:122-4.
- Graser Y, Kuijpers AFA, Presber W, De Hoog SG. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* Complex. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3329-36.
- Graser Y, De Hoog SG, Summerbell RC. Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med Mycol.* 2006; 44:199-209.
- Kane J, Salkin IF, Weitzman I, Smitka C. *Trichophyton raubitschekii* sp. nov. *Mycotaxon* 1981; 13:259-66.
- Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30:33-9.
- Kamisinski G. The routine use of modified Borelli's lactrimel agar (MBLA). *Mycopathologia.* 1985; 91:57-9.
- Toro M, Casanova D, Piontelli E. Análisis fenotípico del complex *Trichophyton rubrum* en los medios de Sabouraud, Lactrimel, y la técnica de Fischer & Kane. *Boletín Micológico de Chile.* 2006; 21:91-7.
- Ellis D, Stephen D, Alexion H, Handke R, Bartley R. Descriptions of Medical Fungi. 2^{da} edition. Australia: The University of Adelaide; 2007.
- Beguín H, Hendrickx M, Planard C, Stubbe D, Detandt M. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. *Med Mycol.* 2012; 50:871-82.
- Medero T, Briceño T, de Albornoz MB, Díaz E. Relación clínica microscópica del *T. rubrum*. *Venezuela. Rev Dermatol Ven.* 1985; 23:53-5.
- Cabañes SFJ. Identificación de hongos dermatofitos. *Rev Iberoam Micol.* 2001.
- Ajello L, Gorg LK. *In vitro* hair cultures for differentiating between a typical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopath Mycol Appl.* 1957: 3-17.
- Fischer J, Kane J. The detection of contamination in *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycopath Mycol Appl.* 1971; 43:169-80.
- Summerbell R, Rosenthal S, Kane J. Rapid method for differentiation of *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, and related dermatophytes species. *J Clin Microbiol.* 1988; 26:2277-82.
- Manual de identificación de actinomicetes. Disponible en <http://www.doctorfungus.org/thelabor/sec13.Pag.7.pdf>. Acceso 15 octubre 2014.
- Serrano Gallego R. Introducción al análisis de datos experimentales. Tratamiento de datos de bioensayos. España: Editorial Universidad Jaume I. Servicio de Comunicación y Publicaciones; 2003.
- Chistensen H. Estadística paso a paso. 3era. edición. México: Editorial Trillas; 1997.

24. Briceño S, Villegas N, Mendoza L, Castillo C, Scorza J. Aislamiento e identificación de dermatofitos, agentes causales de dermatomicosis en el estado Trujillo, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 2004; 24:1-2.
25. Yusel A, Al-Ali Z. *Trichophyton mentagrophytes*' de makrokonidia olusumu. T Parazitol Derf 1993; 17:59-63.
26. Guoling Y, Xiaohong Y, Jingrong L, Liji J, Lijia A. A study on stability of phenotype and genotype of *Trichophyton rubrum*. Mycopathologia. 2006; 161:205-12.
27. Graser Y, Frohlich J, Presber W, de Hoog S. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. J Med Microbiol. 2007; 56:1058-65.
28. Ates A, Ozcan K, Ilkit M. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. Med Mycol. 2008; 46:811-22.
29. Sinski JT, Van Avermaete D, Kelley LM. Analysis of tests used to differentiate *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes*. J Clin Microbiol. 1981; 13:62-5.
30. Gómez E, Crespo V, Samaniego E, del Boz J, Martínez S. *Tinea cruris (glutealis)* de importancia por *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* en España. Rev Iberoam Micol. 2008; 25:250-3.