



Aislamiento ambiental de *Sporothrix globosa* en relación a un caso de esporotricosis linfo-cutánea

Rodrigo Cruz, Peggy Vieille y David Oschilewski

Sporothrix globosa isolation related to a case of lymphocutaneous sporotrichosis

Introduction: *Sporothrix schenckii* complex comprises a group of environmental dimorphic fungi that cause sporotrichosis. In Chile, isolated cases have been reported in humans, though no environmental isolates have been described. **Objective:** To achieve isolation of *Sporothrix* complex from the soil where a 75 year old patient with lymphocutaneous sporotrichosis performs horticulture work. **Materials and Methods:** In March and July 2011 soil and plant debris from five sectors where the patient does his work in horticulture was extracted. The soil samples were diluted and inoculated in Sabouraud agar with cycloheximide and chloramphenicol at 26 °C. The plant debris was directly inoculated in the same medium. Colonies suggestive of *Sporothrix* complex were reseeded in PDA agar at 26 °C and identified as recommended by Marimon et al. **Results:** Of the 10 plates from the first sampling, one colony was identified as *Sporothrix globosa*. In the second sampling, *Sporothrix globosa* grew in two plates seeded with soil, with a total of 6 colonies. There was no growth of *Sporothrix* complex in plant debris. The isolate from the patient was also identified as *Sporothrix globosa*. **Conclusion:** For the first time in Chile a species of *Sporothrix* complex was isolated from the environment. *Sporothrix globosa* was the species identified both in the ground and from the patient with sporotrichosis.

Key words: Sporotrichosis, *Sporothrix globosa*, environment.

Palabras clave: Esporotricosis, *Sporothrix globosa*, ambiente.

Universidad de Valparaíso.

Laboratorio de Micología (RC).

Laboratorio de Micología y

Anatomía Patológica (PV).

Cátedra de Dermatología (DO).

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Financiado con fondos propios del laboratorio, Universidad de Valparaíso.

Recibido: 12 de noviembre de 2011

Aceptado: 26 de mayo de 2012

Correspondencia a:

Rodrigo Cruz Choappa

rcruzchoappa@gmail.com

Introducción

Sporothrix schenckii complex comprende un grupo de hongos dimórficos, ampliamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en la tierra, restos vegetales y plantas^{1,2}. Su estado sexual aún no ha sido descrito; sin embargo, se relaciona estrechamente con *Ophiostoma stenoceras*^{3,4}. Son los agentes causales de la esporotricosis, un tipo de micosis subaguda o crónica frecuente en América Latina, principalmente en lugares donde existe un clima tropical o subtropical, con suelos de alto contenido orgánico, temperaturas cercanas a 25°C y una humedad relativa sobre 90%⁵. Las formas clínicas de esta infección son variables, siendo más común la presentación linfo-cutánea de extremidades, seguida de la forma fija o cutánea localizada y en menor porcentaje, las formas diseminadas y extra-cutáneas^{6,7}. Afecta principalmente a granjeros, jardineros, agricultores, veterinarios o a aquellas personas que están en contacto con sustratos orgánicos y que presentan algún trauma cutáneo, por ejemplo, con espinas de rosas u otras plantas^{2,5,7}.

Trabajos moleculares y fenotípicos recientes demuestran que *S. schenckii* corresponde a un complejo de especies (*Sporothrix* complex), en el cual se encuentran tres de importancia médica (*S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis* y *S. globosa*), además de *S. mexicana* y *S.*

albicans, aisladas sólo del ambiente hasta el momento⁸⁻¹¹. Las tres primeras especies pueden presentar virulencia y formas clínicas diferentes¹².

En América, se han comunicado casos desde E.U.A hasta Argentina; con mayor frecuencia en México, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Venezuela, Colombia, Brasil y Uruguay⁷⁻¹³. En Chile, se han presentado casos aislados de esporotricosis humana^{14,15}; sin embargo, hasta la fecha no se ha comunicado aislamiento alguno de este hongo desde el ambiente. Piontelli y cols., sugieren la presencia de *S. complex* (sin poder obtenerse la cepa pura por estar mezclada con *O. stenoceras*) en especies de *Eucalyptus* y asociada a un coleóptero (*Ectinogonia buqueti* Spin)³.

Presentamos un caso de esporotricosis linfo-cutánea autóctono, en una paciente de 75 años, residente en el sector de Las Dichas (Valparaíso), quien había sufrido un traumatismo con una espina de rosa en el dedo índice derecho (Figura 1). El diagnóstico se realizó mediante microscopía directa y cultivos de las lesiones de mano y antebrazo derechos. La paciente fue tratada con itraconazol vo, 200 mg al día, durante 4 meses, con buena respuesta clínica, por lo que actualmente se encuentra asintomática y realizando nuevamente sus actividades en el campo.

Motivados por este caso, efectuamos un estudio am-



biental en el terreno donde la paciente realizaba a diario sus actividades de horticultura, con el objetivo de lograr el aislamiento e identificación de especies de *S. complex*, y de ser así, comparar estas cepas con aquella aislada desde la paciente.

Materiales y Métodos

El terreno donde se tomaron las muestras ambientales pertenece a Las Dichas, localidad de aproximadamente 500 habitantes, ubicado en el espesor de la cordillera de la costa de la Región de Valparaíso, en el camino de Casablanca a Algarrobo. Es una zona rural donde abundan los animales de corral y las huertas familiares¹⁶. Se identificaron cinco sectores donde la paciente desarrollaba usualmente labores de horticultura y donde pudo haber sufrido la inoculación del agente. Durante dos meses se tomaron veinte muestras (diez por mes) de suelo y de restos vegetales de los sectores identificados como:

- Área 1: rosal
- Área 2: sauce
- Área 3: chacra
- Área 4: gallinero
- Área 5: contigua al gallinero y la chacra



Figura 1. Lesiones granulomatosas linfo-cutáneas que nacen desde el dedo índice hasta el antebrazo derecho.

Para el análisis de suelo, se emplearon tubos cónicos estériles Miniplast® de 15 ml, los cuales fueron numerados según la identificación anterior. Cada uno fue adicionado con 2,5 g de tierra correspondiente más 12,5 ml de agua estéril. Los tubos fueron agitados en *vortex* por 2 min y dejados en reposo por 20 min. Luego se extrajo de c/v 0,5 ml de sobrenadante por tubo para ser sembrado en placas Petri con agar Sabouraud con cicloheximida (400 µg/L) más cloranfenicol (125 µg/L) e incubadas a 26°C. El crecimiento en cada placa fue controlado bajo lupa estereoscópica cada 48 h.

Los restos vegetales fueron depositados directamente, sin tratamiento previo, sobre la superficie de una placa con los mismos medios antes señalados. Igual que con las muestras de tierra, las placas se incubaron a 26°C y fueron revisadas cada 48 h. De las colonias sugerentes de *S. complex*, se realizaron resiembras en agar papa dextrosa (PDA) a 26°C hasta obtener colonias libres de otros hongos y/o bacterias contaminantes.

En la identificación de las especies de *Sporothrix* se consideró la clave morfo-fisiológica propuesta por Marimon y cols.¹⁰ (Tabla 1). Las colonias fueron caracterizadas según color, textura, crecimiento y producción de pigmentos. El estudio fisiológico fue realizado en agar PDA a 30, 35 y 37°C por 21 días. La asimilación de carbohidratos (sucrosa y rafinosa) se realizó en una base nitrogenada¹⁷. El estudio microscópico consideró el diámetro de las hifas y conidióforos y la forma, tamaño, coloración y disposición de los conidios.

Resultados

De las diez placas evaluadas en la primera serie de muestras, se obtuvo una colonia del área 5 de la siembra de tierra, de color crema, que posteriormente se tornó oscura y formó abundante micelio. Parte de esta colonia se sembró en caldo cerebro-corazón a 35°C, lográndose la conversión a su estado levaduriforme (formas redondas, ovals y algunas alargadas con forma de “cigarro”).

En la segunda serie de muestras, de las diez placas estudiadas, hubo desarrollo de la misma especie en una placa del área 5 y en una del área 4 (ambas siembras de tierra), con un total de seis colonias. No hubo desarrollo de colonias compatibles con *S. complex* en los restos vegetales sembrados de los dos muestreos.

Estudio morfo-fisiológico de las colonias: Incubadas en PDA a 30°C por 21 días las colonias tuvieron un crecimiento de hasta 35 mm de diámetro, con color crema hasta la segunda semana, luego adquirieron un color oscuro (Figura 2). A 35°C hubo desarrollo de hasta 6 mm de diámetro y a 37°C no hubo desarrollo de hongos. En las pruebas de asimilación de azúcares hubo positividad para sucrosa, pero no para rafinosa.

Tabla 1. Identificación morfo-fisiológica de especies de *Sporothrix complex*

Especie	Presencia de conidios sésiles pigmentados	Colonias en PDA a 30°C exceden los 50 mm en 21 días	Crecimiento a 37°C	Test de asimilación	
				Sucrosa	Rafinosa
<i>S. albicans</i>	No	Sí	Sí	+	-
<i>S. brasiliensis</i>	Sí	No	Sí	-	-
<i>S. globosa</i>	Sí	No	No	+	-
<i>S. mexicana</i>	Sí	Sí	Sí	+	+
<i>S. schenckii</i>	Sí	No	Sí	+	+

Marimon y cols.¹⁰. PDA: agar papa dextrosa.

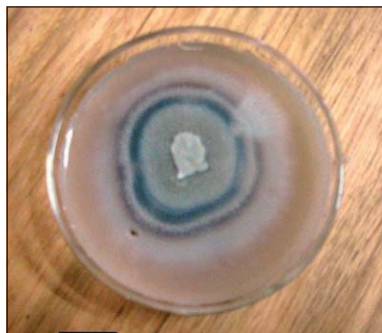


Figura 2. Colonia oscura de 21 días de desarrollo en PDA. La marca corresponde a 1 cm.

Estudio microscópico: Durante la primera semana se observaron hifas delgadas, hialinas, septadas y ramificadas con abundantes conidios hialinos, en cúmulos en la región terminal del conidióforo, de tipo simpodial, en su mayoría globosos a subglobosos, con 2 a 5 μm de largo por 1 a 3 μm de ancho (Figura 3). Transcurrida la segunda semana de incubación, se observó desarrollo de conidios pigmentados secundarios (raduloconidios), predominantemente globosos a subglobosos, con 2,5 a 4 μm de largo y 2 a 3,5 μm de ancho (Figura 4).

Todos estos resultados fueron compatibles con *S. globosa* según la clave morfofisiológica propuesta por Marimon y cols.¹⁰ (Tabla 1).

La cepa aislada de la paciente presentó total coincidencia morfo-fisiológica y microscópica con las cepas aisladas desde la tierra de las áreas señaladas, por lo que también fue identificada como *S. globosa*.

Discusión

En Chile, la esporotricosis es una enfermedad poco frecuente, con algunos reportes de presentación linfocutánea, principalmente en extremidades^{14,15}. El caso que originó este estudio ambiental se presentó en un paciente con antecedente de un trauma por espina de rosa en labores de horticultura, situación que coincide con los casos publicados en la literatura científica nacional e internacional^{6,14,15,18,19}.

Las condiciones geográficas y climáticas del sector de Las Dichas en Valparaíso corresponden a un clima templado-cálido, con lluvias invernales, una estación seca prolongada (7 a 8 meses), gran nubosidad y una humedad atmosférica promedio de 82%²⁰, las que no serían favorables para el desarrollo del hongo; no obstante, hubo desarrollo de *Sporothrix* en las dos muestras tomadas, con mayor número de colonias en invierno, donde las temperaturas en la zona estudiada bajan considerablemente.

Estudios moleculares han demostrado la existencia de varias especies patógenas relacionadas con *S. schenckii*; tales como *S. brasiliensis* y *S. mexicana*, las

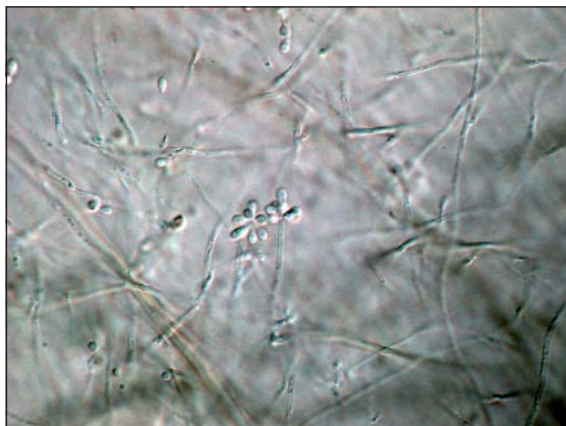


Figura 3. Micelio fino con conidios hialinos subglobosos simpodiales a los 10 días de cultivo. Microscopía DIC 100X.

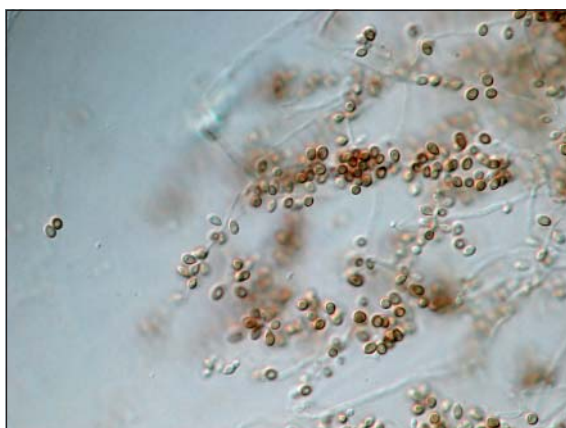


Figura 4. Conidios sésiles café oscuros (raduloconidios) a los 15 días de cultivo. Microscopía DIC 100X.

que se encuentran exclusivamente en Brasil y México, respectivamente. En cambio, *S. schenckii* y *S. globosa* tienen una distribución trans-oceánica²¹. Se ha aislado *S. globosa* en el Reino Unido, España, Italia, China, Japón, India, México y en el centro-sur de los E.U.A.⁹. Los aislamientos de *S. globosa* realizados en este estudio son los primeros en nuestro país, lo que tiene una importancia no solamente epidemiológica, sino también de patogenicidad, ya que *S. schenckii* y *S. brasiliensis* pueden provocar lesiones cutáneas y diseminadas; en cambio, *S. globosa* no provocaría infección cutánea diseminada o compromiso extracutáneo, ya que a pesar de presentar conidios secundarios, no logra un adecuado desarrollo a 37°C¹².

Los conidios oscuros, por producción de melanina, le dan las características más importantes a las colonias y son las estructuras infectantes que presentan menor susceptibilidad a la luz UV, a la ionización y a la acción de radicales libres, además de presentar mayor resistencia a la fagocitosis. Los compuestos melanoides se ponen de manifiesto en medios de cultivo como PDA y alpiste negro, tal como las cepas obtenidas en nuestro estudio,



considerándose como un factor propio de cepas patógenas que pueden llegar a originar esporotricosis^{22,23}.

Marimon y cols.¹⁰ proponen una clave morfo-fisiológica para diferenciar las especies clínicamente relevantes de *S. complex*, basada en la pigmentación de los conidios, crecimiento en PDA a diferentes temperaturas y asimilación de azúcares. Este método tiene la ventaja de ser de bajo costo y, por lo tanto, posible de realizar en la mayoría de los laboratorios de micología. Sin embargo, la secuenciación del gen de la calmodulina es una herramienta útil en investigación, con una alta especificidad en la identificación de las especies del complejo, ya que pueden existir variaciones morfológicas que pueden llevar a errores taxonómicos^{10,24}.

Creemos que es necesario aumentar la sospecha clínica de esporotricosis en nuestro medio, además de realizar otros estudios ambientales con el fin de determinar la extensión y colonización de este agente en otros lugares y sustratos. Por otra parte, será fundamental implementar a corto plazo la identificación molecular de las distintas especies de *S. complex* y así complementar los estudios morfo-fisiológicos que comienzan a realizarse en nuestro país y Latinoamérica.

Agradecimientos: A Eduardo Piontelli del Laboratorio de Micología de la Universidad de Valparaíso por su ayuda en la identificación de las especies y a Jenny Llanos del laboratorio de Microbiología de la Universidad de Valparaíso por las correcciones del texto y a Genoveva Choappa por sus infinitas enseñanzas y alegrías.

Resumen

Introducción: *Sporothrix schenckii complex* comprende un grupo de hongos dimórficos ambientales que provocan esporotricosis. En Chile se han comunicado casos aislados en humanos; sin embargo, no se han descrito aislamientos de este hongo desde el ambiente. **Objetivos:** Orientados por un caso de esporotricosis linfocutánea en una paciente de 75 años, se realizó un estudio ambiental para lograr el aislamiento de *S. complex* desde el suelo donde la paciente realizaba labores de horticultura. **Materiales y Métodos:** Se extrajo tierra y restos vegetales de cinco sectores donde la paciente efectuaba sus labores de horticultura. Se realizaron diluciones de tierras y siembra en agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol a 26°C. Los restos vegetales fueron sembrados directamente en el mismo medio. Las colonias sugerentes de *S. complex* se resembraron en agar PDA a 26°C y se identificaron según recomendación de Marimon y cols. **Resultados:** De las diez placas del primer muestreo, una colonia de la siembra de tierra se identificó como *Sporothrix globosa*. En el segundo muestreo hubo desarrollo de *S. globosa* en dos placas sembradas con tierra, con un total de seis colonias. No hubo desarrollo de *S. complex* en los restos vegetales. La cepa aislada desde la paciente también fue identificada como *S. globosa*. **Conclusión:** Por primera vez en Chile se logra el aislamiento del ambiente de una especie de *S. complex*. *Sporothrix globosa* fue la especie identificada tanto del suelo como desde la paciente con esporotricosis.

Referencias bibliográficas

- 1.- Mackinnon J E, Conti-Díaz I A, Gezuele E, Civila E, da Luz S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. *Sabouraudia* 1969; 7: 38-45.
- 2.- Mendoza M, Díaz E, Alvarado P, Romero E, Bastardo de Albornoz M C. Aislamiento de *Sporothrix schenckii* del medio ambiente en Venezuela. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 317-9.
- 3.- Piontelli E, Palma M A, Torelli L. *Ectinogonia buquetii* Spinola (Coleoptera) vector de *Ophiostoma stenoceras* (Robak) Melin & Nannf en bosques de *Eucalyptus* de la V región. *Bol Micol* 2006; 21: 63-70.
- 4.- De Beer Z W, Harrington T C, Vismer H F, Wingfield B D, Wingfield M J. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* 2003; 95: 434-41.
- 5.- Tapia N C, Rivera G R, Sabanero G, Trejo B R, Sabanero L M. *Sporothrix schenckii*: cultivos en diferentes suelos. *Rev Latinoam Microbiol* 1993; 35: 191-4.
- 6.- Rodríguez G H, Magaña R M C, Juárez L, Arenas R. Esporotricosis cutánea diseminada: comunicación de un caso. *Dermatología Rev Mex* 2008; 52: 228-30.
- 7.- Arenas R, Fernández R, Arce M. Micosis subcutáneas: esporotricosis, cromoblastomicosis y micetoma. Vilata JJ, editor. *Micosis Cutáneas*. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana 2006, p. 131-47.
- 8.- Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Matsumoto T, Padhye A A, Mendoza M, et al. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathologia* 1998; 142: 115-8.
- 9.- Ishizaki H, Kawasaki M, Mochizuki M T, Jin X Z, Kagawa S. Environmental isolates of *Sporothrix schenckii* in China. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2002; 43: 257-60.
- 10.- Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton D A, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3198-206.
- 11.- Madrid H, Cano J, Gené J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26: 218-22.
- 12.- Arrillaga M I, Capilla J, Fernández A M, Fariñas F, Mayayo E. Diferencias en la patogenicidad del complejo de especies *Sporothrix* en un modelo animal. *Patología* 2010; 48: 82-7.
- 13.- Arenas R. Esporotricosis. En *Micología Médica Ilustrada*. Arenas R, editor. Editorial McGraw-Hill Interamericana 2004. p. 149-60.
- 14.- Flores C, Ferrada L, De la Parra M. Estudio micológico y experimental de un caso de esporotricosis. *Bol Micol* 1982; 1: 39-42.
- 15.- Escaffi M J, Benedetto A, Podlipnik S, Díaz M C, Misad C. Esporotricosis cutánea: revisión a propósito de un caso contraído en Chile. *Rev Chilena Dermatol* 2010; 26: 154-58.
- 16.- Municipalidad de Casablanca. <http://www.e-casablanca.cl> (Acceso: 29 de junio de 2011).
- 17.- Land GA, Vinton E C, Adcock G B, Hopkins J M. Improved auxanographic method for yeast assimilations: a comparison with other approaches. *J Clin Microbiol* 1975; 2: 206-17.



- 18.- Rubio G, Sánchez G, Porras L, Alvarado Z. Esporotricosis: prevalencia, perfil clínico y epidemiológico en un centro de referencia en Colombia. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 75-9.
- 19.- López J G, Rebolledo M. Esporotricosis linfocutánea en paciente pediátrico. *Rev Asoc Colomb Dermatol* 2009; 17: 180-2.
- 20.- Dirección de Aeronáutica de Chile. Dirección Meteorológica de Chile. <http://www.meteochile.gob.cl/> (Acceso: 04 de agosto de 2011).
- 21.- Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3251-6.
- 22.- Sánchez-Alemán M A, Araiza J, Bonifaz A. Aislamiento y caracterización de cepas silvestres de *Sporothrix schenckii* e investigación de reactores a la esporotricosis. *Gac Med Mex* 2004; 140: 507-13.
- 23.- Howard D H, Orr G F. Comparison of strains of *Sporothrix schenckii* isolated from nature. *J Bacteriol* 1963; 85: 816-21.
- 24.- Romeo O, Scordino F, Criseo G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathologia* 2011; 172: 179-86.