

COMUNICACIÓN BREVE

Rojo neutro: Nuestra experiencia de diagnóstico en micosis superficiales en cinco pacientes

NEUTRAL RED: OUR EXPERIENCE IN DIAGNOSIS OF SUPERFICIAL MYCOSES IN FIVE PATIENTS

Due to differences in the result of the Direct Microscopic Test (DMT) and culture for fungi, the technique of neutral red supravital coloration has been put to practice and in this manner, evaluate the mycological cure. Patients and Methods: In order to achieve this purpose, 30 patients with presumptive diagnosis of superficial mycosis submitted from the Capital City of Córdoba and surrounding districts were evaluated. Once the laboratory diagnosis was confirmed, clinical cases with the following requirements were selected: patients with skin mycosis in different zones; had not received previous treatment for mycosis. Five patients who fulfilled both previous requirements, wanted to receive complete antifungal treatment and accepted to undergo both, clinical and laboratory periodical follow-ups, were enrolled. The material obtained from the selected patients was assessed with the habitual technique of microscopic observation (KOH and heat). At the same time fungal cultures were performed, the coloration of neutral red was utilized in each of the selected patients. The results obtained were very promising. This fact allowed us to put this technique into practice as a routine. Besides, its low price constitutes an advantage that can be applied to any laboratory that makes mycologic diagnosis.

Key words: *Superficial mycosis, Skin mycosis, Neutral red.*

Introducción: Suele presentarse discordancia de resultados entre el examen microscópico directo (EMD) y cultivo micológico.^{1,2} En el caso de infección micótica prolongada y tratada, el cultivo es positivo en un alto porcentaje de los casos. Esta situación impide determinar con exactitud la cura micológica del paciente, lo que conlleva a realizar tratamientos inadecuados para el mismo.

Basándonos en las propiedades supravitales del colorante rojo neutro (3 amino-7 dimetil amino-2 metil furazide hidroclorehídrico), tinctura soluble en agua que atraviesa la membrana plasmática intacta del hongo y se almacena en los lisosomas de las células viables - cuando las membranas de las células están alteradas, el colorante no ingresa a los lisosomas³ - decidimos aplicarlo conjuntamente con la técnica de KOH y calor, en materiales obtenidos de pacientes con micosis superficiales, en los cuales estudiamos la viabilidad de dermatofitos y *Malassezia* spp. De esta manera pudimos determinar con exactitud la cura micológica, luego de implementar el tratamiento adecuado.

Material y Método: Se entrevistaron 30 pacientes con diagnóstico presuntivo de micosis superficiales en el periodo comprendido entre mayo de 1997 y

junio de 1998. De ellos se seleccionaron 5 pacientes que reunieron los siguientes criterios: presentar lesiones con diferentes localizaciones en piel y fanerios, causadas por dermatofitos y *Malassezia* spp; al momento de la consulta no habían recibido tratamiento etiológico previo; y se comprometían a realizar tratamiento antifúngico y controles periódicos de laboratorio y clínicos. Todos dieron su consentimiento informado. Los pacientes procedían del consultorio externo de Dermatología del Hospital Nacional de Clínicas y otros centros asistenciales de la ciudad de Córdoba. (Argentina).

El diagnóstico de micosis fue realizado, en todos, en el Laboratorio de la Primera Cátedra de Dermatología del Hospital Nacional de Clínicas.

Para este estudio se consignaron aspectos epidemiológicos: edad, sexo, ocupación, hábitos y lugar de nacimiento.

Los pacientes fueron seguidos con la técnica que se detalla a continuación, antes, durante y con posterioridad al tratamiento con anti-micóticos. Se obtuvieron las muestras micológicas por raspado de lesiones con bisturí estéril, previa preparación del paciente con lavados de infusión de manzanilla, extrayéndose material que fue dividido en 3 alícuotas similares: una alícuota se trató con KOH al 40% y

calor para EMD en 40X, otra fue tratada con solución rojo neutro disuelto en *buffer* fosfatos (PBS), a una concentración de 100 µgr/ml y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas; y la restante fue sembrada en medios de cultivos de agar lactrimel, conteniendo 50 µgr/ml de cloranfenicol, e incubada a 28°C durante 20 días³⁻⁵. No se realizó cultivo en aquellos pacientes que presentaban lesiones con elementos compatibles con *Malassezia* spp. Los cultivos que desarrollaron fueron observados macroscópicamente y microscópicamente (40X) e identificados por test bioquímico (producción de ureasa). Fueron utilizados también medios de cultivos como agar-harina de maíz (para observación de características morfológicas y difusión del pigmento) y agares diferenciales para *Tricho-phyton*, como agar basal-caseína N° 1^{6,7}.

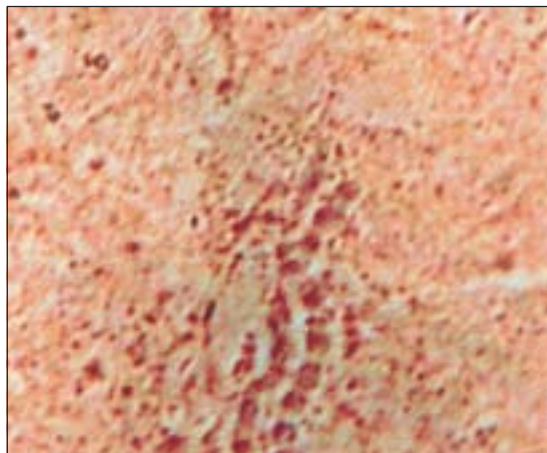


Figura 1. Hifa coloreada con rojo neutro.



Figura 2. Hifa coloreada con rojo neutro.

Resultados: El estudio inicial en cada uno de los pacientes dio coloración de rojo neutro positivo (tinción de elementos fúngicos) y cultivos positivos, habiendo concordancia total con el EMD realizado con KOH al 40% y calor (Figuras 1 y 2).

Control a los 30 días: En el EMD con rojo neutro se visualizaron elementos fúngicos con morfología y coloración alterada (Figura 3), mientras que con KOH y calor sólo se observó presencia de las mismas. Los cultivos fueron negativos en los pacientes 1, 2 y 3. (Tabla 1). No se practicó cultivo en el paciente 4, en cambio se desarrolló *Trichophyton mentagrophytes* en este control en el paciente 5.

Control a los 60 días: Solamente se observó hifas con morfología y coloración alterada al EMD con rojo neutro en las uñas de manos en el paciente 1; y en región glútea, entrepiernas, dorso y abdomen en el paciente 5. No se observó morfología fúngica en este control en el paciente 4.⁸⁻¹⁰ En el EMD con KOH y calor se observó presencia de los mismos, siendo los cultivos negativos.

Discusión: Estudios realizados por otros autores, sugieren que la coloración de rojo neutro provee un método útil para la evaluación de la viabilidad fúngica en escamas de piel y que la discrepancia entre microscopia directa y cultivo puede ser explicada por el hecho de que algunos elementos fúngicos no son viables en los materiales obtenidos de estos pacientes.^{3,11-13} En esta serie de 5 pacientes con micosis superficiales pudimos corroborar lo anteriormente publicado por otros autores.

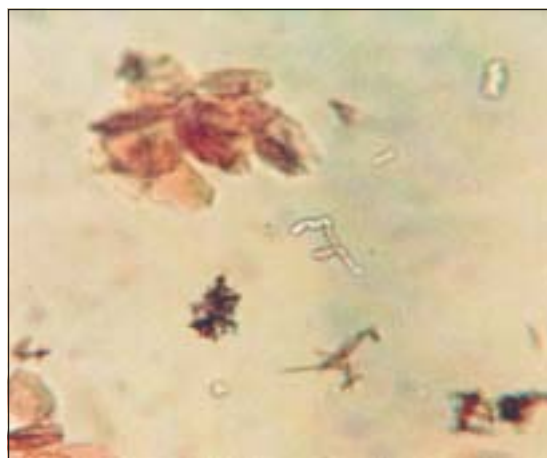


Figura 3. Hifa coloreada con rojo neutro.

Tabla 1. Características clínicas y evolución de los exámenes micológicos directos y cultivo durante la terapia antifúngica en 5 pacientes

Paciente y localización	EMD		1° control 30 días				2° control 60 días			Tratamiento
	RN	KOH	EMD		Cultivo		EMD		Cultivo	
			RN	KOH			RN	KOH		
Paciente 1										
Uñas mano	+ ¹	+ ²	<i>Tm</i> ⁴	HA ³	+	-	HA	+	-	Itraconazol x 200mgrs c/12 horas (2 pulsos)
Uñas pie	+	+	<i>Tm</i>	HA	+	-	- ⁵	- ⁶	-	
Paciente 2										
Planta pie	+	+	<i>Tm</i>	+	-	-				Ketoconazol 200 mgrs/día (15 días)
Paciente 3										
Dorso mano	+	+	<i>Tr</i> ⁷	HA	+	-				Ketoconazol 200 mgrs/día (30 días)
Dorso tórax	+	+	<i>Tr</i>	HA	+	-				
Región inguinal	+	+	<i>Tr</i>	HA	+	-				
Región submaleolar	+	+	<i>Tr</i>	HA	+	-				
Paciente 4										
Dorso tórax	+	+	No se practicó HA		+		No se practicó	-	-	Ketoconazol tópico (uso diario por 30 días)
Paciente 5										
Glúteos	+	+	<i>Tm</i>	+	+	<i>Tm</i>	HA	+	-	Ketoconazol 200 mgrs/día (15 días)
Entrepiernas	+	+	<i>Tm</i>	+	+	<i>Tm</i>	HA	+	-	
Dorso tórax	+	+	<i>Tm</i>	+	+	<i>Tm</i>	HA	+	-	
Abdomen	+	+	<i>Tm</i>	+	+	<i>Tm</i>	HA	+	-	

R.N.¹ (+): Hifas coloreadas con rojo neutro.

KOH² (+): Se observan elementos fúngicos.

H.A.³: Hifas con morfología y coloración alterada.

*T.m*⁴: *Trichophyton mentagrophytes*

R.N.⁵ (-): No se observan elementos con morfología fúngica con rojo neutro.

KOH⁶ (-): No se observan elementos fúngicos con KOH y calor.

*T.r*⁷: *Trichophyton rubrum*

Graciela M. Carballo, Germán Ambach, Nora B. Peralta y Silvina García.

Facultad de Ciencias Médicas, Hospital Nacional de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba República Argentina: Laboratorio de la Primera Cátedra de Dermatología (G.M.C., N.B.P.)

Primera Cátedra de Dermatología (S.G.)

Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba y Hospital San Roque (G.A.)

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- ALBRECHT M C, CARBALLO G M, MARTINEZ J. Agentes causantes de dermatomicosis. Evaluación del examen directo *versus* cultivo. Actas VIII. Congreso Argentino de Micología. San Miguel de Tucumán, Argentina, 1998.
- 2.- LEFLER E, HAIM S, MERZBACH D. Evaluation of direct microscopic examination versus culture in the diagnosis of superficial fungal infections. *Mykosen* 1981; 24: 102-6.
- 3.- NAKA W, HANYAKU H, TAJIMA S, HARADA T, NISHIKAWA T. Application of neutral red staining for evaluation of the viability of dermatophytes and *Candida* in human skin scale. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 31-5.
- 4.- NEGRONI R. Micosis superficiales de la piel y sus faneras. 13-18. Procesamiento de muestras clínicas de Laboratorio. 109-126. Lecciones de Micología Medica. Bs. As. Editorial. 1° Ed. 1996.
- 5.- RIPPON J W. Infecciones superficiales, infecciones cutáneas, Dermatofitos y dermatomicosis. Tratado de Micología Medica. Philadelphia. Ed. Interamericana. 1990: 169-299
- 6.- MARTINEZ LOPEZ R, MENEDEZ TORRES L J,

- HERNANDEZ HERNANDEZ F, CASTAÑON OLIVARES R. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.* México. Ed. Trilles. 1° ed. 1995: Cap. I: 1-24, Cap. II: 25-30, Cap. III: 31-54.
- 7.- KONEMAN E W, ROBERTS G D. *Micología Práctica de Laboratorio.* Bs. As. Ed. Médica Panamericana. 3° ed. 1995: Cap. 3: 47-63, Cap. 4: 63-73, Cap. 6: 103-175.
- 8.- PANCONESI E, DIFONZO E. Treatment of dermatophytoses and pityriasis versicolor with itraconazole. *Rev Infect Dis* 1987; 9 Suppl 1 S109-13.
- 9.- GALIMBERTI R L, VILLALBA I, GALARZA S, RAMONDI A, FLORES V. Intraconazole in pityriasis versicolor. Ultrastructural changes in *Malassezia furfur* produced during treatment. *Rev Infect Dis* 1987; 9 Suppl 1: S134-8.
- 10.- PEREIRO M M. Situación actual de las infecciones por *Malassezia*. *Piel* 1999; 14: 76-87.
- 11.- NISHIKAWA T, NAKA W. Evaluation of antifungal effects of terbinafine and itraconazole using red staining. *Br J Dermatol* 1994; 130 Suppl 43: 4-6
- 12.- KOLOTILA M P, SMITH C W, ROGERS A L. Candidacidal activity of macrophages from three mouse strains as demonstrated by a new method: neutral red staining. *J Med Vet Mycol* 1987; 25: 283-90.
- 13.- BORG M, KIRK D, BAUMGARTEN H AND RUCHEL R. A colorimetric assay of the assessment of cytotoxicity of yeasts. *J Med Vet Mycol* 1984; 22: 357-67.

Correspondencia a:
Graciela M. Carballo
E-mail: bestmariel@latinmail.com