

AISLAMIENTO DE CEPAS QUERATINOLITICAS, CON MODIFICACION DEL ANZUELO QUERATINOSO.

Delia P. Alvarez — Blanca J.C. de Bracalenti

Departamento de Microbiología e Inmunobiología.
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.
Universidad Nacional de Rosario — Suipacha 531.
Rosario (2000). Santa Fe — República Argentina.

RESUMEN

De muestras de suelo correspondiente a sectores ocupados por espacios libres —plazas, parques, baldíos— comprendidos en la zona urbana de la ciudad de Rosario (República Argentina), se aislaron cepas de hongos queratinolíticos-filicos, entre ellos dermatofitos geofílicos, utilizando como anzuelo queratinoso: pelos estériles de caballo y de niño, con y sin tratamiento alcalino. La alcalinización del anzuelo queratinoso, determinó que éste fuera utilizado por un mayor número de colonias con capacidad queratinolítica, no relacionadas a los dermatofitos.

La ausencia de grupos SH^- libres en el desarrollo *in vitro*, de *Microsporium gypseum* y *Keratinomyces ajelloi* sobre las queratinas hidrolizadas, nos hizo pensar que la degradación de las mismas, se realiza en forma distinta a la estudiada empleando queratinas nativas, o sin hidrolizar, las cuales forman radicales tioles, como catabolitos.

Esta variante metabólica, necesaria para la queratinólisis, pudo ser aprovechada por otras cepas que se muestran competitivas con un sustrato en esas condiciones.

INTRODUCCION

El estudio de la micota queratinolítica de los espacios libres de los suelos del sector urbano de la ciudad de Rosario (República Argentina) y su relación con los casos de dermatofitosis (3) nos permite establecer el rol que tiene ese complejo ecosistema como reservorio de agentes patógenos y los cambios de adaptación que presentan algunos dermatofitos, como *Microsporium canis* y *Trichophyton mentagrophytes* (2) (4) con excepcionales aislamientos de los suelos.

Microsporium gypseum, *Keratinomyces ajelloi*, son los más frecuentes entre los dermatofitos geofílicos y en la actualidad, el primero es responsable de una incidencia cada vez mayor en nuestra casuística de dermatofitosis, mientras el segundo, ha sido descrito recientemente como causante de lesiones humanas (1) (9).

SUMMARY

[Isolation of keratinolytic fungi, with the hair bait technique modified]

Strains of keratinolytic fungi and geophilic dermatophytes among them, have been isolated from samples of soils taken from open air spaces such as squares, parks, and lots of the Rosario city, urban area (Argentina).

Sterile hair of children and horses with and without alkaline treatment was used as keratinic baits. The modification of the hair baiting technique was used in a major amount of colonies with keratinolytic capacity non related with dermatophytes.

The presence of SH^- free groups in the growth "in vitro" of *Microsporium gypseum* and *Keratinomyces ajelloi* on the hydrolyzed keratines has not been demonstrated. Therefore we consider its degradation is carried out in a different way from the studied structure using native keratines or without hydrolyzing with the ones that are formed thiol radicals, as catabolites. This metabolic variable, necessary for the keratinolysis, could produce the overcoming represented by other strains that appear competitive with a substrate under such conditions.

Pudimos comprobar, asimismo, un mayor aislamiento de dermatofitos geofílicos en su forma anamórfica como teleomórfica, al ser inhibidos los gérmenes proteolíticos amonificantes, comportándose así, estas bacterias, como competitivas o protocoadadoras de nutrientes más simples, al coexistir con las cepas queratinolíticas (comunicación personal).

A fin de conocer la influencia, que sobre el aislamiento de esas cepas tiene la modificación de las condiciones estructurales del sustrato queratinoso, éste fue sometido a un tratamiento alcalino.

Dada las nuevas posibilidades que en el estudio de la capacidad queratinolítica de cepas de interés clínico puede aportar esa modificación del anzuelo queratinoso, consideramos de interés comunicar las experiencias realizadas.

MATERIAL Y METODO

Se analizaron 30 (treinta) muestras de suelo,

repartidas en cuatro series, las que fueron procesadas en igual forma que en un trabajo anterior (3), utilizando como anzuelo queratinoso: pelos de crines de caballo y de niño, con y sin tratamiento alcalino. Este tratamiento de las queratinas, que provoca su hidrólisis, fue practicado por suspensión de los pelos, en una solución de KOH al 10% , durante cinco minutos, con agitación, a temperatura ambiente. Luego de repetidos lavados con agua destilada, se procedió a esterilizarlos, 20 minutos a 120° C.

Las placas de siembra se humectaron con agua destilada estéril, conteniendo 2,5 mg/ml. de Actidione.

Al cabo de ocho semanas de incubación entre 25 y 30° C, se procedió al aislamiento de las cepas desarrolladas sobre el substrato, en el medio de Sabouraud-glucosa-cloromicetina. Con posterioridad se identificaron en Sabouraud-glucosa, de acuerdo a sus características de cultivo, macro y micro-morfológicas.

El material queratinoso, con y sin tratamiento alcalino fue además, suspendido en agua destilada estéril, empleando tales suspensiones como medio de cultivo de *M. gypseum* y *K. ajelloi*, aislados de los suelos.

En el filtrado de esos cultivos, luego de veinte días de incubación a 28° C, se hizo la detección de los grupos SH⁻, según la técnica de Schaad, R.; Bachmann, R. y Gilgen, A., que utiliza como reactivo específico de los radicales tioles, el 2,2 dithiobis-5-nitropiridina (6).

RESULTADOS Y DISCUSION

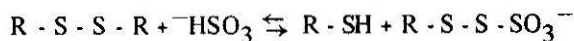
En el Cuadro N° 1, se presentan las cepas identificadas, observándose que los pelos de crines de caballo, estériles, sin tratamiento alcalino, constituyen el anzuelo queratinoso más efectivo, para el aislamiento de los dermatofitos en sus estados anamórficos y teleomórficos, siguiendo en eficacia los pelos de niños, en iguales condiciones.

Al relacionarse el número de colonias aisladas, para las distintas especies, de acuerdo al anzuelo queratinoso utilizado, y según lo indica el Cuadro N° 1, se destaca una marcada disminución de las correspondientes a *M. gypseum*, *K. ajelloi*, *T. terrestris*, *M. cookei*, como de las formas sexuadas: *Nannizzia incurvata*, *Arthroderma uncinatum*, y de las especies de *Chrysosporium* y *Geomyces*, en oposición al mayor desarrollo de otros géneros como

Fusarium, *Aspergillus*, *Acremonium*, cuando se emplearon queratinas hidrolizadas.

Se comprobó que esta variación se debía a un comportamiento competitivo entre especies queratinolíticas coexistentes, pues *M. gypseum* y *K. ajelloi*, con mayor número de aislamientos, se desarrollan muy bien sobre queratinas hidrolizadas, en tierras estériles, de tal forma que la disminución observada de esos dermatofitos pudo deberse a un factor de competencia con otras cepas capaces de utilizar las queratinas hidrolizadas, sin desarrollar un mecanismo de adaptación enzimático a las nuevas condiciones estructurales del anzuelo.

En la prueba de esta hipótesis, se tuvo en cuenta que los dermatofitos producen sulfitos (5) (8) por oxidación de la cistina, durante el desarrollo en substratos queratinosos, in vitro. Los sulfitos son capaces de romper las uniones disulfuros de esas estructuras, dando radicales tioles, de acuerdo a la siguiente reacción:



En una etapa posterior a la sulfitolisis, las queratinas son degradadas por acción enzimática de las queratinasas.

Aplicando la técnica de Schaad, Bachmann y Gilden (6) para determinar mínimas concentraciones de tioles, con la 2,2 dithiobis, 5-nitropiridina, se comprobó que en el filtrado de los cultivos de *M. gypseum* y *K. ajelloi*, sobre queratinas de pelos hidrolizados de caballo y de niños, no se pudieron valorar radicales SH⁻, pero sí, en el filtrado del desarrollo sobre queratinas no desnaturalizadas.

Se postula, de acuerdo a este resultado, que la reacción de sulfitolisis con las queratinas hidrolizadas no se ha producido y que la adaptación de otros recursos metabólicos frente a queratinas así tratadas, pudo determinar que otras cepas presentes en los suelos compitan por el substrato en el proceso de queratinolisis, con un desarrollo mayor y en menos tiempo del que necesitan los dermatofitos geofílicos aislados.

CUADRO N° 1

Número de muestras, en las que se han aislado cepas queratinolíticas-fílicas utilizando como anzuelo queratinoso pelos de crines de caballo, estériles (P.C.E.) y tratados con KOH (P.C.T.); pelos de niños, estériles (P.N.E.) y tratados con KOH (P.N.T.).

CEPAS AISLADAS	ANZUELOS QUERATINOSOS							
	P.C.E.		P.C.T.		P.N.E.		P.N.T.	
	Nº	o/o	Nº	o/o	Nº	o/o	Nº	o/o
Microsporum gypseum (Bodin) Guiart & Grigorakis	18	28,1	7	14,0	10	25	2	6,1
Microsporum cookei . Ajello	3	4,7	1	2	2	5	1	3,0
Keratinomyces ajelloi Vanbreuseghem	10	15,6	2	4,0	6	15	1	3,0
Trichophyton terrestre . Durie & Frey	6	9,4	2	4,0	4	10	2	6,0
Nannizzia incurvata . Stockdale	8	12,5	4	8,0	4	10	3	9,1
Arthroderma uncinatum . Dawson & Gentles	6	9,4	2	4,0	2	5	1	15,1
Geomyces pannorum (Link) Sigler & Carmichael	4	5,2	2	4,0	1	2,5	2	6,1
Chrysosporium keratinophilum . Frey & Carmichael	6	9,4	3	6,0	1	2,5	1	3,0
Aspergillus spp.	2	3,1	8	16,0	4	10	2	6,1
Fusarium spp.	1	1,5	16	30,0	5	12,5	12	36,3
Acremonium spp.			4	8,0	1	2,5	6	18,2
Total de cepas aisladas	64		50		40		33	

El porcentaje está dado sobre el total de cepas con cada anzuelo queratinoso.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alvarez, D.; Bracalenti, B.C. de (1982). Dermatofitia por *Trichophyton ajelloi*. Mycopathologia, 77 : 27-29
- 2.- Baxter, M. (1966). Isolation of *Trichophyton mentagrophytes* from british soil. Sabouraudia, 4: 207-208.
- 3.- Bracalenti, B.C. de; Alvarez, D.; Colella, G. (1975). Ecología de los dermatofitos. I Correlación entre dermatofitias y hongos queratinofílicos de suelos de Rosario. Sabouraudia, 13 : 235-262.
- 4.- Envolceanu, R.; Alteras, S.; Cojacaru, J. (1962). Considérations sur la présence du *Trichophyton mentagrophytes* dans le sol. Mycopathologia Appl., 16 : 342-350.
- 5.- Kunert, J. (1972). Thiosulphate esters in keratin attacked by dermatophytes in vitro. Sabouraudia, 10: 6-13.
- 6.- Schaad, R.; Bachmann, R.; Gilgen, A. (1969). The use of 2,2-dithiobis-(5 nitropyridina) as a selective reagent for the detection of thiols. J. Chromatog., 41 : 121-123.
- 7.- Weary, P.E.; Cawley, C.M.; Cawley, E.D. (1965). Keratinolytic activity of *Microsporum canis* and *M. gypseum*. Journal of Investigation Dermatology, 44 : 300-310.
- 8.- Weary, P.E.; Cawley, C.M. (1967). Keratinolytic activity of *Trichophyton schoenleinii*, *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*. Journal of Investigations Dermatology, 48 : 240-248.
- 9.- Presbury, D.G.C.; Young, C.M. (1978). *Trichophyton ajelloi* isolated from a child. Sabouraudia, 16 : 233-235.