

## Comunicación corta

### Utilidad del Litmus Milk® para la diferenciación de los complejos de especies *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*

Ana María Capote, Giuseppe Ferrara, María Mercedes Panizo\*, Nataly García, Víctor Alarcón, Maribel Dolande

*Departamento de Micología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela.*

Recibido 24 de julio de 2017; aceptado 29 de septiembre de 2017

**Resumen:** El objetivo de esta investigación fue evaluar la utilidad del medio Litmus Milk® para la diferenciación de los complejos de especies *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Se emplearon 52 aislamientos del género *Trichophyton*, identificados a nivel de género y especie según sus características macro y micromorfológicas en cultivo; adicionalmente se emplearon la prueba de hidrólisis de la urea, así como crecimiento y alcalinización del medio Litmus Milk®. Se identificaron 43 aislados como complejo *T. rubrum*, los cuales mostraron características morfológicas propias del complejo, crecimiento restringido sin alcalinización del agar Litmus Milk® e hidrólisis de urea negativa. Los nueve aislados restantes se identificaron como complejo *T. mentagrophytes* y todos mostraron las características morfológicas propias del complejo, crecieron profusamente y alcalinizaron el agar Litmus Milk® e hidrolizaron la urea. El agar Litmus Milk® puede utilizarse como herramienta complementaria para la diferenciación del complejo *T. rubrum* del complejo *T. mentagrophytes*.

**Palabras clave:** Litmus Milk®, complejo *Trichophyton rubrum*, complejo *Trichophyton mentagrophytes*, pleomorfismo.

### Use of Litmus Milk® for the differentiation of the *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* species complex

**Abstract:** The aim of this research was to evaluate the use of the Litmus Milk® medium for the differentiation of the *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* species complex. Fifty-two isolates of the genus *Trichophyton* were used. The identification at genus and species level was made according to their macro and micromorphological characteristics in culture. In addition, the urea hydrolysis as well as the growth and alkalization of the Litmus Milk® medium were used. Forty-three isolates were identified as *T. rubrum* complex, which showed the morphological characteristics of the complex, restricted growth without alkalization of Litmus Milk® agar, and negative urea hydrolysis. The remaining nine isolates were identified as *T. mentagrophytes* complex, and all showed the morphological characteristics of the complex, grew profusely and alkalized the Litmus Milk® agar and hydrolyzed urea. Litmus Milk® can be used as a complementary tool for the differentiation of *T. rubrum* complex from the *T. mentagrophytes* complex.

**Keywords:** Litmus Milk®, *Trichophyton rubrum* complex, *Trichophyton mentagrophytes* complex, pleomorphism.

\* Correspondencia:  
E-mail: mmpanizo@gmail.com

#### Introducción

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos queratinofílicos taxonómicamente relacionados que causan las dermatofitosis, constituido por tres géneros: *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*. Entre ellos, el agente etiológico más frecuentemente aislado, tanto en Venezuela como a nivel mundial es el complejo *Trichophyton rubrum*, seguido del complejo *Trichophyton mentagrophytes* [1-3].

En la actualidad, la gran mayoría de los dermatofitos se pueden identificar a nivel fenotípico según las características

de las colonias en cultivo puro y la morfología microscópica. Estos criterios, sin embargo, pueden ser insuficientes, ya que el aspecto de las colonias puede variar o ser similar para diferentes especies. En ocasiones, la pigmentación característica puede no estar presente, y los aislados, especialmente los del género *Trichophyton*, pierden la capacidad de esporulación. Debido a esto, es posible que se requieran medios especiales para estimular la producción de pigmentos y la esporulación, así como pruebas fisiológicas adicionales, junto con la morfología, para identificar correctamente las especies [2,3].

Los estudios fenotípicos siguen siendo la opción menos costosa para la identificación de los dermatofitos en el laboratorio de microbiología de rutina. Las estrategias de identificación molecular, que implican la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de las regiones de los espaciadores de transcripción internos (ITS) son actualmente el patrón oro, y son muy útiles identificando aislados de comportamiento fenotípico inusual. Sin embargo, rara vez son aplicables, excepto en los laboratorios de referencia [2-4].

Las pruebas fisiológicas complementarias que se utilizan en la identificación de los dermatofitos son: perforación del pelo *in vitro*, estudio de requerimientos nutricionales especiales, hidrólisis de la urea, crecimiento en granos de arroz pulido, termotolerancia, asimilación de sorbitol, prueba de opacidad con Tween, tolerancia a las sales y crecimiento en agar púrpura de bromocresol-glucosa-sólidos lácteos (Agar BCPMSG) [2-4].

El agar BCPMSG es útil especialmente para distinguir el complejo *T. rubrum* del complejo *T. mentagrophytes*. El complejo *T. rubrum* muestra un crecimiento restringido y no produce reacción alcalina, mientras que los miembros del complejo *T. mentagrophytes* típicamente muestran un crecimiento profuso y una reacción alcalina. Los cultivos a ensayar se inoculan en el agar y se examinan para el cambio de pH y las características de crecimiento a los siete días de incubación a 25-28 °C. Un cambio de color de azul pálido a violeta púrpura indica una reacción alcalina [2-6].

El medio Litmus Milk® ha sido empleado principalmente en bacteriología industrial para evidenciar la producción de ácido láctico por bacterias en la leche [7]. En micología se ha utilizado para evaluar la actividad proteolítica de los hongos dematiáceos [8]. Su composición es similar al agar BCPMSG: contiene leche descremada que aporta lactosa (fuente de carbono), caseína, lactoalbúmina, lactoglobulina (fuentes de nitrógeno), y un indicador de pH llamado litmus, que cambia de color morado a azul intenso con la alcalinización del medio. Por otra parte, como es un indicador obtenido a partir de líquenes, aporta menor toxicidad a los microorganismos que el púrpura de bromocresol (Tabla 1) [7].

Debido a la similitud entre ambos medios, el objetivo de

esta investigación fue evaluar la utilidad del medio Litmus Milk® para la diferenciación del complejo *T. rubrum* del complejo *T. mentagrophytes*.

## Materiales y métodos

**Aislamientos:** Se emplearon 52 aislamientos fúngicos pertenecientes al género *Trichophyton*, obtenidos a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes atendidos en el Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR) durante el año 2016. El trabajo contó con el aval de la Gerencia de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del INHRR. Estos aislamientos fueron identificados fenotípicamente a nivel de género y especie sobre la base de sus características macro y micromorfológicas en cultivo. Adicionalmente se emplearon la prueba de hidrólisis de la urea, así como la capacidad de crecimiento y alcalinización en el medio Litmus Milk®.

**Morfología macroscópica:** Los aislados fueron sembrados en agar Sabouraud dextrosa (SDA, Oxoid), Dermasel® (Oxoid) y Lactrimel de Borelli con actidiona, e incubados a 28 °C por dos semanas, para evaluar sus características macroscópicas. Los cultivos fueron evaluados en cuanto al aspecto, textura y pigmentación del anverso y reverso de la colonia [2-4,9].

**Morfología microscópica:** Se realizaron microcultivos en agar papa dextrosa (PDA, Oxoid) y agar extracto de malta (EMA, Oxoid), se incubaron a 28 °C y se observaron al microscopio óptico entre los 7 y 15 días [2-4,9].

**Hidrólisis de urea:** Se utilizó el agar urea de Christensen (Oxoid), sembrando los aislados en el medio de cultivo e incubando a 28 °C por 7 a 10 días con observación diaria. La presencia de la actividad enzimática de la ureasa se evidencia entre las 48 y 72 horas [2-4].

**Crecimiento y alcalinización en el medio Litmus Milk®:** Se elaboró según las especificaciones del fabricante Fluka Analytical, añadiéndole 15 g/L de agar para solidificar el medio, y se dispensó en placas de Petri descartables de 90 mm de diámetro.

En el medio solidificado se inocularon los aislados, incubándolos por 7 días a 28 °C. Se evaluó la alcalinización del medio por viraje del pH evidenciando el cambio de color púrpura a azul intenso, así como las características de crecimiento, considerando colonias con crecimiento restringido aquellas con un radio de crecimiento menor o igual a 10 mm [5].

**Cepas control:** Se utilizaron las cepas *T. rubrum* D-412000-45 y *T. mentagrophytes* (ATCC® MYA 4439™), conocida actualmente como *T. interdigitale* (ATCC® MYA 4439™); esta cepa ATCC fue reidentificada como *T. interdigitale* en el complejo de especies *T. mentagrophytes* basado en el análisis de secuencias multigénicas [10]. Ambas cepas

Tabla 1. Comparación entre la composición del agar púrpura de bromocresol-glucosa-sólidos lácteos y el medio Litmus Milk® [6,7].

Agar púrpura de bromocresol-glucosa-sólidos lácteos		Litmus Milk®	
Leche descremada en polvo	40 g/L	Leche descremada en polvo	100 g/L
Púrpura de bromocresol (1,6 % en alcohol)	1 mL	Litmus	0,5 g/L
Glucosa	20 g/L	Sulfito de sodio	0,5 g/L
Agar	20 g/L	Agar*	15 g/L
pH 7,0 ± 0,3		pH 6,8 ± 0,2	

\* El medio es líquido; para solidificarlo es necesario agregarle agar.

pertenecen a la micoteca del Departamento de Micología del INHRR.

Todos los aislamientos y las cepas control fueron tratados bajo las mismas condiciones.

## Resultados

De los 52 aislados ensayados, 43 se identificaron como complejo *T. rubrum* y nueve como complejo *T. mentagrophytes*.

Todos los aislados identificados macroscópicamente como complejo *T. rubrum* presentaron colonias de aspecto elevado y crecimiento algodonoso de color blanco en el anverso de los medios de cultivo SDA, Dermasel®, PDA y Lactrimel de Borelli, y un pigmento color rojo vino que se difunde al medio, evidenciado en el reverso de los agares PDA y Lactrimel. Microscópicamente, presentaron microconidios piriformes abundantes, con escasos microconidios esféricos y ausencia de macroconidias (Figura 1 A y B).

Todos los aislados identificados macroscópicamente como complejo *T. mentagrophytes* presentaron colonias de aspecto plegado, pulverulentas y blanquecinas en el anverso de los medios de cultivo SDA, Dermasel®, PDA y Lactrimel de Borelli, y un color marrón rojizo a amarillo ocre al reverso, sin pigmento difusible, en los medios PDA y Lactrimel. Microscópicamente, presentaron abundantes microconidios esféricos agrupados en racimos a lo largo de la hifa, hifas en espiral, escasos microconidios piriformes y escasas macroconidias (Figura 1 A y B).

Ninguno de los aislados identificados como complejo *T. rubrum* hidrolizó la urea, no alcalinizaron el agar Litmus Milk® y su crecimiento fue restringido en este medio de cultivo. Es importante acotar que si se observa el medio

luego de siete días de incubación, se podrán ver cambios en el color y un crecimiento más abundante de *T. rubrum*, por lo tanto, el resultado de la prueba debe leerse entre el quinto y séptimo día (Figura 1 C, D y E).

Todos los aislados identificados como complejo *T. mentagrophytes* hidrolizaron la urea a las 72 horas de incubación y alcalinizaron el agar Litmus Milk® entre los cinco y siete días de incubación, presentando además un crecimiento profuso en este medio de cultivo, con colonias de 20 o más milímetros de diámetro (Figura 1 C, D y E).

Los resultados obtenidos mediante el uso de las cepas control permitieron verificar la eficacia de todos los medios de cultivo utilizados en el trabajo, y particularmente del agar Litmus Milk®. La cepa *T. interdigitale* (ATCC® MYA 4439™) mostró las características morfológicas macro y microscópicas propias del complejo *T. mentagrophytes*: hidrolizó la urea y alcalinizó el agar Litmus Milk®, además de crecer profusamente. La cepa *T. rubrum* D-412000-45 reprodujo las características morfológicas del complejo, no hidrolizó la urea, no alcalinizó el agar Litmus Milk® y creció de forma restringida en ese medio.

## Discusión

El agar Litmus Milk® permitió evaluar la propiedad de alcalinización por parte del complejo *T. mentagrophytes* así como su capacidad de crecimiento frente al complejo *T. rubrum*, que no posee estas propiedades, por lo que demostró su utilidad para diferenciar estos dos complejos. Por otra parte, los resultados obtenidos se correspondieron con los de la prueba de hidrólisis de urea y la morfología macro y microscópica.

Durante la revisión realizada no se encontraron

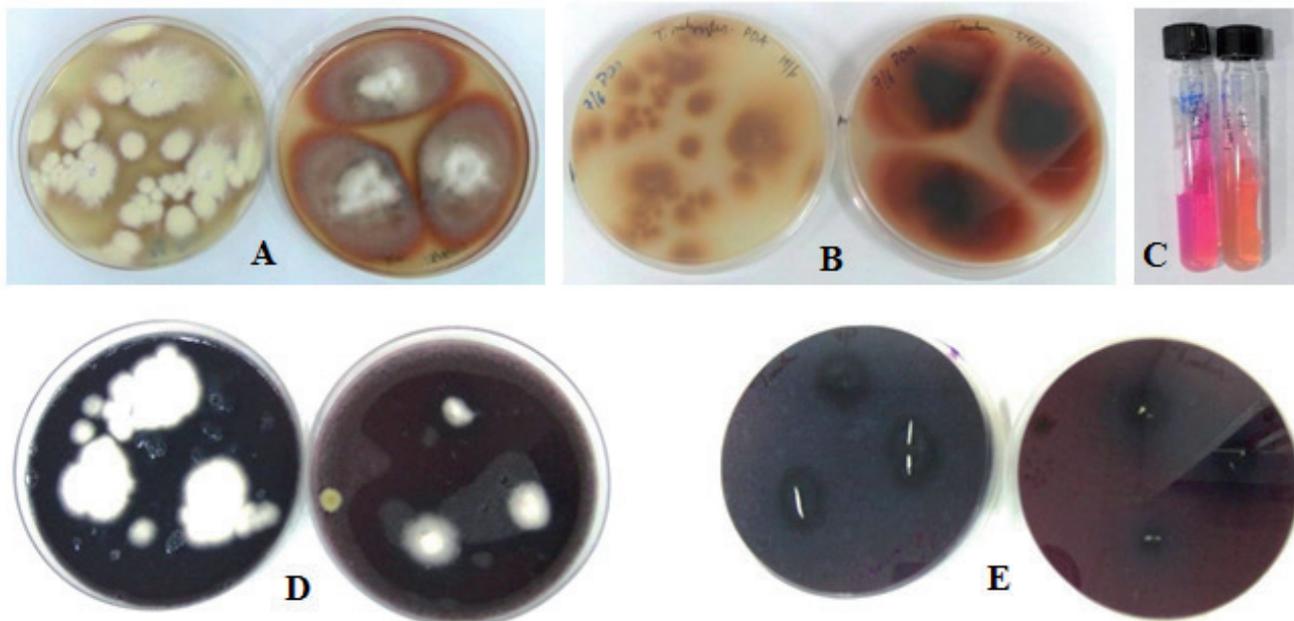


Figura 1. A. Anverso del medio PDA. Izquierda: complejo *T. mentagrophytes*. Derecha: complejo *T. rubrum*. B. Reverso del medio PDA. Izquierda: complejo *T. mentagrophytes*. Derecha: complejo *T. rubrum*. C. Prueba de hidrólisis de la urea. Izquierda: complejo *T. mentagrophytes* (Positiva). Derecha: complejo *T. rubrum* (Negativa). D. Anverso del medio de Litmus Milk®. Izquierda: complejo *T. mentagrophytes*. Derecha: complejo *T. rubrum*. E. Reverso del medio de Litmus Milk®. Izquierda: complejo *T. mentagrophytes*. Derecha: complejo *T. rubrum*.

publicaciones en las que se utilizara el agar Litmus Milk® como medio de cultivo complementario para la identificación de dermatofitos, pero los resultados de este trabajo son muy similares a los obtenidos por otros autores utilizando el agar púrpura de bromocresol-glucosa-sólidos lácteos (Agar BCP-MS-G) [4,6,11], el cual se usa para los mismos fines que fue utilizado el agar Litmus Milk® en este estudio.

El complejo *T. rubrum* agrupa cepas de la variante cosmopolita (*T. rubrum sensu stricto*) y de la variante afroasiática (*T. raubitschekii*, *T. fluviomuniense* y *T. kanei*). Por su parte, el complejo *T. mentagrophytes* agrupa cepas zoofilicas (*T. mentagrophytes sensu stricto*, las cepas adaptadas a los animales de *T. interdigitale*, los estados anamorfos de *Arthroderma vanbreuseghemii* y *A. benhamiae*, así como especies raras tales como *T. eriotrephon* y *T. bullosum*), cepas antropofilicas (incluye las cepas adaptadas al humano de *T. interdigitale* y los estados anamorfos de *A. vanbreuseghemii* y *A. benhamiae*) y variantes nodulares, denominadas anteriormente como *T. krajdennii*, conocidas actualmente como una forma morfológica de *T. interdigitale* [3]. Las pruebas complementarias resultan de gran utilidad para la identificación de los dermatofitos, y en especial, de aquellos que forman complejos de especies fenotípicamente relacionadas y difíciles de diferenciar entre sí, ya que es frecuente observar en ellos pleomorfismo y escasa producción de estructuras reproductivas [2-4,6,11]. Es por esto que al evaluar en conjunto las características microscópicas, la prueba de hidrólisis de urea y la alcalinización y capacidad de crecimiento en el agar Litmus Milk® se pudo lograr la diferenciación fenotípica de los complejos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

El Litmus Milk® es un medio comercial de fácil preparación e implementación en un laboratorio de microbiología de rutina, que puede usarse como herramienta complementaria para la diferenciación de los complejos *T. rubrum* de *T. mentagrophytes*. Se recomienda evaluar este agar en conjunto con otras pruebas como la perforación del pelo *in vitro* e incluso frente al agar BCPMSG, para establecer comparaciones directas, así como su evaluación con una mayor cantidad de aislados, no sólo de los complejos ya nombrados, sino con otros géneros de dermatofitos.

## Referencias

1. Capote AM, Ferrara G, Panizo MM, García N, Alarcón V, Reviakina V, Dolande M. Micosis superficiales: casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela (2001-2014). *Invest Clin*. 2016; 51:47-58.
2. Raymond R, Pihet Marc. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008; 166:295-306.
3. Borman AM, Summerbell RC. *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, and agents of superficial mycoses. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Volumen 2. 11<sup>th</sup> edition. Washington DC: ASM Press; 2015. p 2128-52.
4. 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.
5. Summerbell RC, Rosenthal SA, Kane J. Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species. *J Clin Microbiol*. 1988; 26:2279-82.
6. Fischer J, Kane J. The detection of contamination in *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycopath Mycol Appl*. 1971; 43:169-80.
7. Davis JG. The use of special litmus milk media for the diagnostic culture of lactic acid bacteria: (1) Dextrose litmus milk, (2) Yeast extract litmus milk, and (3) Yeast extract dextrose litmus milk. *J Dairy Res*. 2009; 6:121-4.
8. Espinel-Ingroff A, Goldson PR, McGinnis MR, Kerkering TM. Evaluation of proteolytic activity to differentiate some dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol*. 1988; 26:301-7.
9. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Online version 4.1.4. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2016.
10. American Type Culture Collection product sheet. *Trichophyton interdigitale* (ATCC® MYA 4439TM). Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/MYA-4439.aspx#documentation>. Consultado: 10 de julio 2017.
11. Rodríguez Rojas H, Mendoza M, Correa D, Casares E. Evaluación morfológica y bioquímica de aislados clínicos de *Trichophyton* spp. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2015; 35:33-9.