

# METODO RAPIDO Y SENCILLO PARA VISUALIZACION DE HIFAS EN EL DIAGNOSTICO DE LAS DERMATOMICOSIS

**Dr. Ricardo Perez Alfonso\***  
**Dr. Eduardo Weiss\*\***  
**Lic. Elio Villanueva\*\*\***  
**Instituto de Biomedicina. Caracas**

(Trabajo Ganador Premio  
Foro J. M. Soto)

\* y \*\* Residentes de Postgrado de  
Dermatología. Instituto de  
Biomedicina.  
\*\*\* Asistente Técnico. Laboratorio  
de Micología. Instituto de  
Biomedicina.

## RESUMEN

La búsqueda de hifas en exámenes directos usando hidróxido de potasio, como aclarante de la queratina es un método sencillo, pero se enfrenta con la dificultad del tiempo que es necesario emplear en revisar cuidadosamente las muestras, hasta encontrar las hifas, pudiendo en muchas ocasiones existir confusión con artefactos presentes.

Muchos otros intentos se han realizado para mejorar el clásico método con el hidróxido de potasio, como es el uso de tinta azul Parker, la cual colorea tanto el fondo de la preparación como la hifa contrastando con la mayor tinción de ésta.

El Chiorazol Black E es un colorante biológico específico de la quitina, descrito originalmente en el año 1937 por Cannon como un colorante botánico. Al ser específico de la quitina, éstas colorean verdoso contra un fondo celular grisáceo, que no capta el colorante.

Proponemos a través de este trabajo el uso de Chiorazol Black E en una mezcla con hidróxido de potasio y dimetilsulfóxido (DMSO) como un método más específico y por lo tanto más rápido para la detección de hifas en muestras de pacientes sospechosos de Dermatomicosis.

Revisamos los exámenes directos de 40 pacientes que consultaron al Instituto de Biomedicina entre los meses de Enero y Octubre de 1985, cuyo diagnóstico de micosis superficial había sido comprobado por cultivo. Cada una de las muestras fue procesada a través del clásico método de aclaramiento usando sólo hidróxido de potasio (KOH); con KOH, DMSO y tinta azul Parker; KOH, DIVISO y Lactophenol Cotton Blue y con KOH, DIVISO y Chiorazol Black E. Igualmente evaluamos el tiempo necesario para el aclaramiento de la muestra hasta la visualización de las primeras hifas con cada uno de los métodos.

## INTRODUCCION

En la práctica dermatológica diaria nos enfrentamos, al plantear un diagnóstico clínico de Dermatomicosis, con la tarea de corroborar esta sospecha, mediante el examen directo y si es posible por el cultivo. El cultivo, es un recurso que no se encuentra al alcance de muchos dermatólogos o médicos generales y tardaría, en el mejor de los

casos, quince días, hasta la identificación del agente fúngico causal<sup>(1)(2)</sup> Por lo tanto el examen directo adquiere un valor definitivo ante la necesidad de corroborar el planteamiento clínico.

Hasta el momento han sido usados diversos métodos para aumentar la sensibilidad en la observación de hifas en los exámenes directos.

La búsqueda de hifas en los exámenes directos usando hidróxido de potasio (KOH), como aclarante de la queratina, es un método sencillo, pero se enfrenta con la dificultad del tiempo que es necesario emplear en revisar cuidadosamente las muestras hasta encontrar las hifas, pudiendo en muchos casos existir confusión con artefactos presentes.

Muchos otros intentos se han realizado para mejorar el clásico método con el KOH, como es el añadir azul Parker, la cual colorea tanto el fondo de la preparación como la hifa contrastando con la mayor tinción de esta última <sup>(3)(4)(5)</sup>

En la literatura revisada, se han encontrado diferentes diluciones de la tinta azul Parker en KOH, variando estas concentraciones en: Parker/KOH 10%, 1 a 1<sup>(3)</sup>; Parker/KOH 10%, 1 a 9<sup>(4)</sup>

Otro colorante muy usado en las preparaciones micológicas, sobre todo en dilacerados de cultivos, es el Lactophenol Cotton Blue.<sup>(1)</sup> Dado su reducido poder aclarante, y sus regulares resultados al mezclarlo con KOH, es poco usado en exámenes directos de muestras de pacientes.

El dimetilsulfóxido (DIVISO), solvente orgánico polar, de frecuente uso en los laboratorios, posee la propiedad de disolver tanto sustancias orgánicas como inorgánicas. Esta propiedad ha sido aprovechada para combinarlo con KOH al 10% y al 20% para aumentar la rapidez y efectividad del aclaramiento de la muestra a examinar<sup>(6)(7)</sup>; sin embargo, en la literatura revisada el DMSO se ha usado poco mezclado con colorantes para la visualización de hifas.

El Chlorazol Black E es un colorante biológico, ácido tris-azo, descrito originalmente por Cannon en 1937 como un colorante botánico<sup>(8)(9)</sup> Este colorante biológico, es selectivo para quitina, sustancia constituyente de la pared de la hifa, la cual colorea verdoso, contra un fondo celular grisáceo que no capta el colorante. El Chlorazol Black E mezclado con KOH al 5% y DIVISO al 10% ha sido utilizado previamente en el diagnóstico de las dermatomicosis con excelentes resultados<sup>(9)</sup>.

El objetivo de este trabajo fue corroborar los hallazgos previos en torno a la gran efectividad como colorante específico del Chlorazol Black E y realizar un estudio comparativo entre este, la tinta Parker y el Lactophenol Cotton Blue, en un solvente común constituido por KOH al 5% y DMSO al 10%, experiencia no reportada previamente en la literatura revisada.

## MATERIALES Y METODOS

Se revisaron muestras de escamas, pelos y uñas de 40 pacientes con el diagnóstico clínico de Dermatomicosis, los cuales consultaron al Instituto de Biomedicina entre los meses de Enero y Octubre de 1985. En 36 de estos pacientes se confirmó el diagnóstico de Dermatomicosis por cultivos realizados en el Laboratorio de Micología del mismo Instituto.

Las micosis superficiales se distribuyeron de la siguiente forma:

Tinea corporis: 11 pacientes.  
Tinea capitis: 8 pacientes.  
Tinea unguium: 8 pacientes.  
Tinea pedis: 6 pacientes.  
Tinea cruris: 4 pacientes.  
Tinea manuum: 2 pacientes.  
Otomycosis: 1 paciente.

En cuanto a la etiología, obtenida por cultivo, la distribución fue:

Trichophyton rubrum: 18 pacientes.  
Microsporum canis: 6 pacientes.  
Trichophyton mentagrophytes: 4 pacientes.  
Candida albicans: 3 pacientes.  
Trichophyton tonsurans: 2 pacientes.  
Epidermophyton floccosum: 2 pacientes.  
Aspergillus niger: 1 paciente (otomicosis).  
4 cultivos contaminados.

La coloración con Chlorazol Black E se preparó disolviendo el colorante en dimetil sulfóxido (DIVISO) (100 mgrs. de Chlorazol Black E en 10 mL. de DIVISO). Esto se añadió a 90 mL. de agua destilada que contenía 5 grs. de hidróxido de potasio, la solución fue usada inmediatamente, sin necesidad de filtrar<sup>(3)</sup>

La Tinta azul Parker se preparó usando los mismos solventes que para el Chlorazol Black E (KOH 5% y DIVISO 10%).

El Lactophenol Cotton Blue se preparó siguiendo la fórmula siguiente:

Cristales de phenol ----- 20 grs.  
Acido láctico ----- 20 grs.  
Glicerina ----- 40 grs.  
Cotton Blue ----- 0,05 grs.  
Agua destilada ----- 20 mL.<sup>(3)</sup>

Igualmente se usaron como solventes del Lactophenol Cotton Blue, las mismas sustancias que para el Chiora-

zol y la Tinta Parker (KOH 5% y DIVISO 10%).

Las tres soluciones colorantes fueron guardadas protegidas de la luz, en frascos de vidrio ámbar.

Los planteamientos iniciales del trabajo fueron comparar la efectividad del Chlorazol Black E en relación con el KOH al 10%, sin embargo, en los exámenes directos preliminares realizados nos percatamos de las grandes ventajas que ofrecía el Chlorazol sobre el KOH por lo que decidimos compararlo con otros métodos de observación directa, mejorados mediante la adición de colorantes al KOH, por ejemplo: Tinta azul Parker y Lactophenol Cotton Blue.

Usamos Tinta Parker más KOH al 10% en una relación 1: 1 como ha sido descrito por algunos autores<sup>(3)</sup>, pero era de difícil visualización por lo denso del colorante. Posteriormente utilizamos la Tinta Parker y el KOH al 10% pero en una relación de 1 : 9, con lo cual se mejoró el contraste, sin embargo todavía no era comparable a la gran selectividad y rapidez obtenida con la coloración de Chlorazol Black E.

Así decidimos unificar el solvente (KOH 5%; DMSO 10%) y variar sólo el colorante, usando o Chlorazol Black E o Tinta Parker azul o Lactophenol Cotton Blue.

No sólo evaluamos subjetivamente la especificidad y nitidez de la coloración, sino también el tiempo necesario para obtener la positividad del examen directo.

En todas las pruebas realizadas, siempre se añadieron los tres colorantes al mismo tiempo, calentándose en mechero, evitando que hirviera, y observando primero el Chlorazol, luego la Tinta Parker y por último el Lactophenol, con aumento de 10 X, cronometrando el tiempo invertido en encontrar hifas a esporas, que no ofreciesen dudas diagnósticas.

Una vez revisada toda la muestra, si no se encontraban elementos diagnósticos con aumento de 10 X, se procedía a revisar el material con aumento de 40 X. Se consideraron exámenes directos negativos, las muestras totalmente revisadas, por un tiempo de 5 minutos sin encontrar hifas o esporas.

Es importante recalcar que cada

muestra se dividió en tres porciones iguales, usando en cada parte una solución colorante diferente. De esta forma evitamos un posible error debido a las diferencias de positividad que podían presentarse entre una muestra y otra.

### Análisis Estadístico:

Los análisis estadísticos realizados comprendieron la prueba de Mc.Nemar ( $p < 0.01$ ), para evaluar la significancia estadística de la positividad, según el método de visualización utilizado; y la comparación entre los promedios  $\bar{X}$  de muestras no independientes ( $p = 0.05$ )<sup>(12)(13)</sup>

### RESULTADOS

De las 36 muestras revisadas, encontramos 22 (63,88%) con exámenes directos positivos al usar KOH al 10 %; 26 (72,22%) positivos con la mezcla de KOH al 10%, DIVISO, Tinta Parker; 18 (50%) positivos al usar la solución compuesta por KOH al 10%, DIVISO, Lactophenol; encontrando un total de 34 (94,44%) muestras positivas con la coloración de Chlorazol Black E (Cuadro I; Gráficos I, II, III).

Sometiendo estos resultados al análisis estadístico (Prueba de Mc.Nemar), observamos que el Chlorazol Black E mostró una mayor efectividad estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) en relación a los otros tres métodos aplicados, en las muestras evaluadas (Cuadros II; III; IV).

Al evaluar solamente los 8 pacientes con Tinea unguium encontramos: 7 exámenes directos negativos aclarados sólo con KOH al 10%, mientras que 1 solo fue negativo con Chlorazol, el cual coincidentalmente fue también negativo con el KOH.

Otro aspecto importante encontrado, fue que en su gran mayoría los resultados positivos con Chlorazol Black E, fueron obtenidos con un aumento de objetivo de 10 X, mientras que con la solución de Tinta Parker, en muchos casos fue necesario un aumento de 40 X, para realizar un diagnóstico certero.

También se procedió a comparar el promedio ( $\bar{X}$ ) de tiempo necesario, para dar un diagnóstico certero positivo

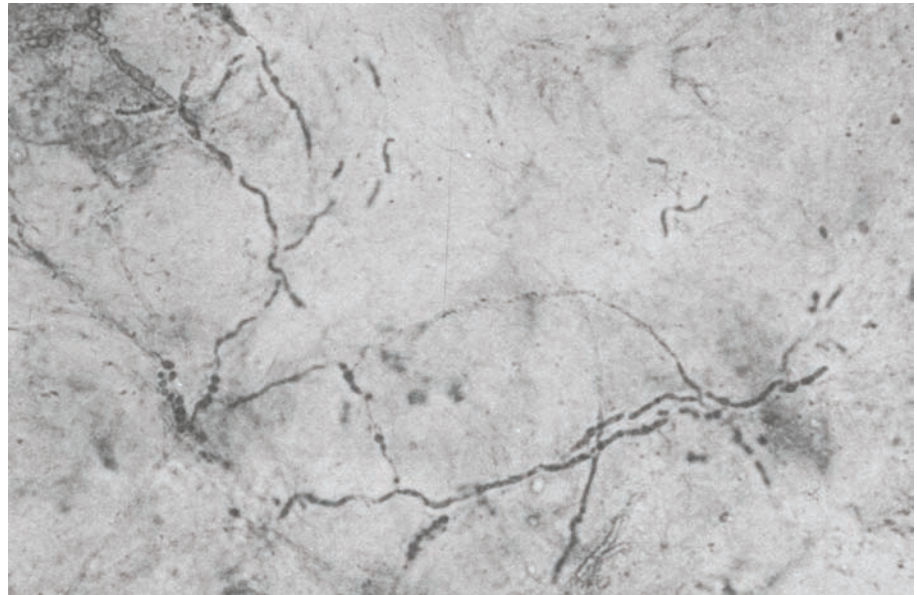


Fig. 1 Visualización de hifas en una muestra de uña, usando Chlorazol Black E. 16X.



Fig. 2 Mayor detalle de las hifas en una muestra de uña teñida con Chlorazol Black E. 25X.

con los diferentes métodos.

El promedio de tiempo usado para el Chlorazol Black E fue de 42,8 seg.  $\pm$  DE 48,7; para la Tinta Parker fue de 45,92 seg.  $\pm$  DE 53,17, mientras que para el Lactophenol Cotton Blue el promedio alcanzó los 91,22 seg.  $\pm$  DE 65,8. Comparando estadísticamente (Comparación de promedios de muestras no Independientes), el Chlorazol

con la solución de Tinta Parker y con el Lactophenol encontramos la existencia de una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), sólo entre el Chlorazol y el Lactophenol; ya que al compararlo con la solución de Tinta Parker no obtuvimos una diferencia con significancia estadística ( $p > 0.05$ ) (Cuadro V; Gráficos IV, V, VI).

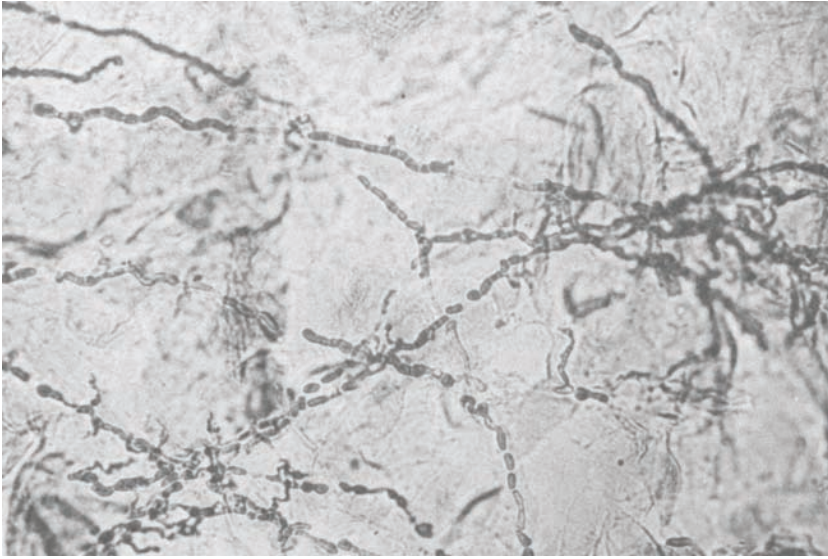


Fig. 3  
Muestra de escamas provenientes de paciente con diagnóstico clínico de Tinéa cruris: Abundantes hifas. Chlorazol Black E. 25X.

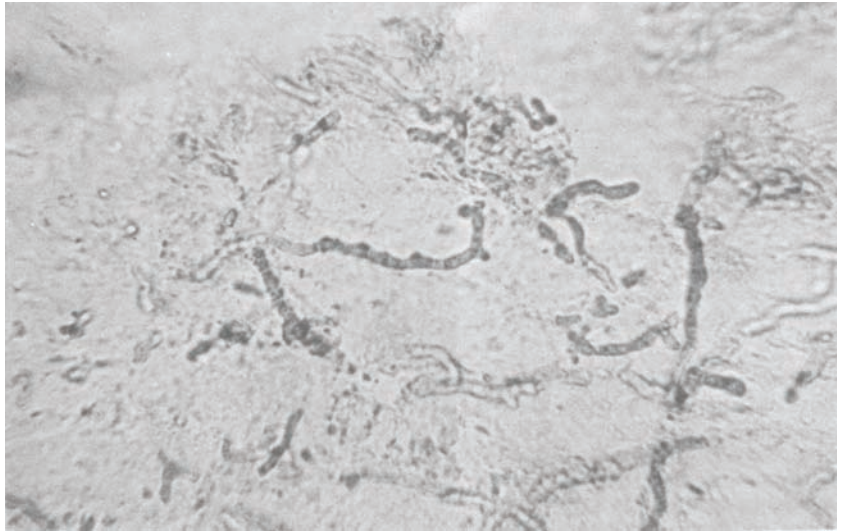


Fig. 4  
Hifas provenientes de Tinéa corporis.  
Chlorazol Black E. 40X.

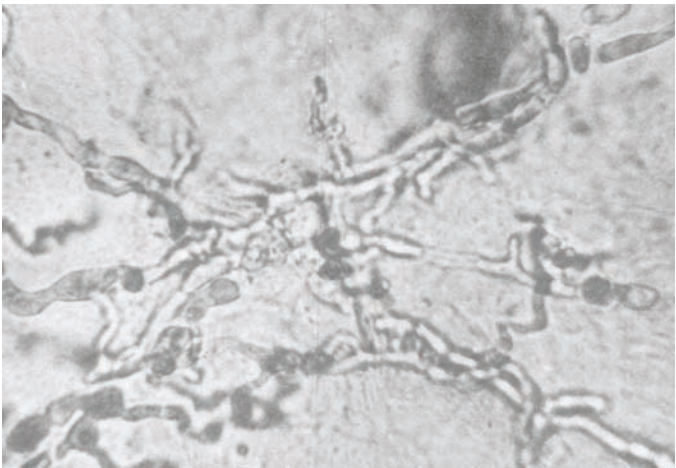


Fig. 5  
Detalle de una muestra de escamas donde se nota la coloración verdosa de las hifas septadas, que resaltan sobre el fondo. Chlorazol Black E. 40X.



Fig. 6  
Tinéa capitis variedad Ectorix: se aprecian claramente esporas teñidas color verdoso por el Chlorazol Black E. 40X.

CUADRO I  
EXAMENES DIRECTOS POSITIVOS  
Total de muestras revisadas: 36

KOH 10%	+.....	22 muestras (63,88%)
Tinta Parker	+.....	26 muestras (72,22%)
Lactophenol	+.....	18 muestras (50,0%)
Chlorazol Black E.	+.....	34 muestras (94,44%)

CUADRO II  
RESULTADOS DE LA APLICACION DE CHLORAZOL BLACK E  
COMPARADO CON KOH AL 10%

Chlorazol	KOH		Total
	-	+	
+	11	23	34
-	2	0	2
Total	13	23	36

CUADRO III  
RESULTADOS DE LA APLICACION DE CHLORAZOL BLACK E  
Y SOLUCION DE TINTA PARKER

Chlorazol	PARKER		Total
	-	+	
+	8	26	34
-	2	0	2
Total	10	26	36

CUADRO IV  
RESULTADOS DE LA APLICACION DE CHLORAZOL BLACK E  
Y DE LACTOPHENOL

Chlorazol	LACTOPHENOL		Total
	-	+	
+	16	18	34
-	2	0	2
Total	18	18	36

GRAFICO I.  
DIRECTOS POSITIVOS SEGUN  
EL METODO USADO

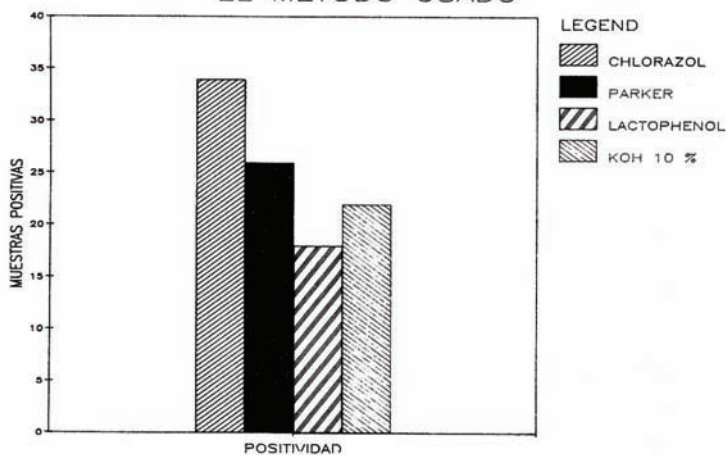
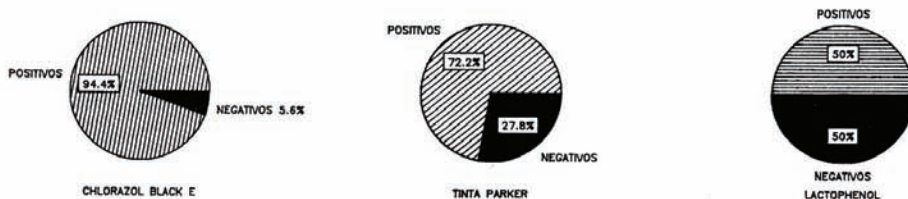
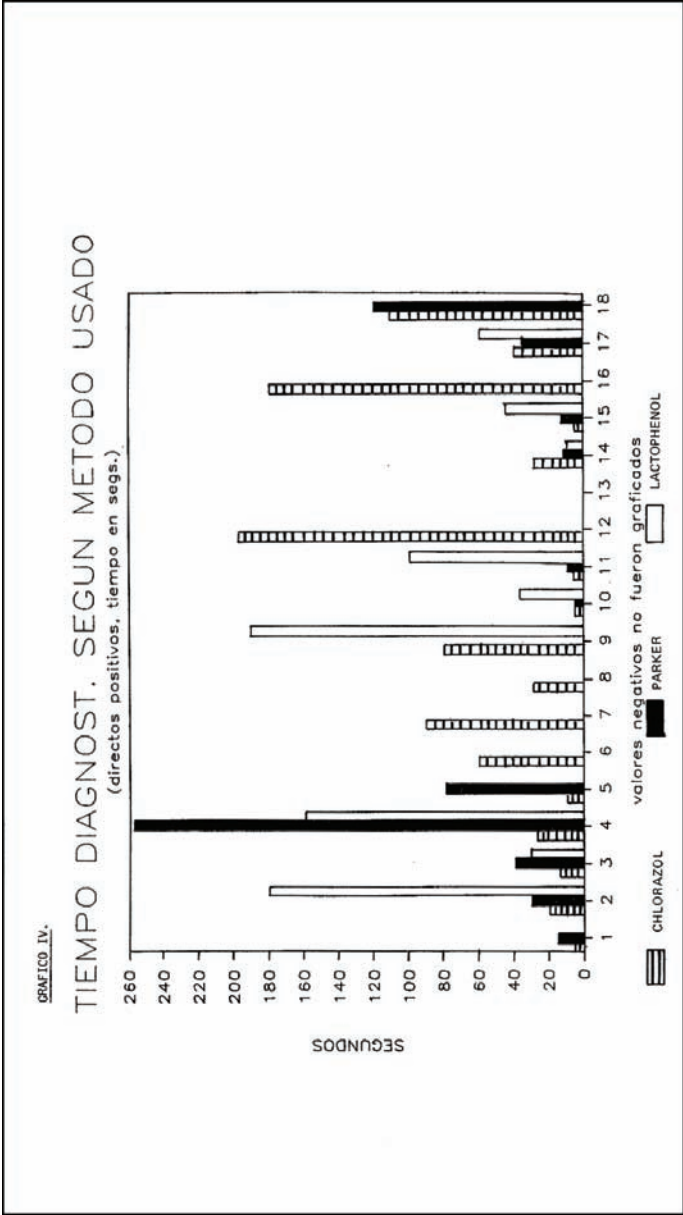
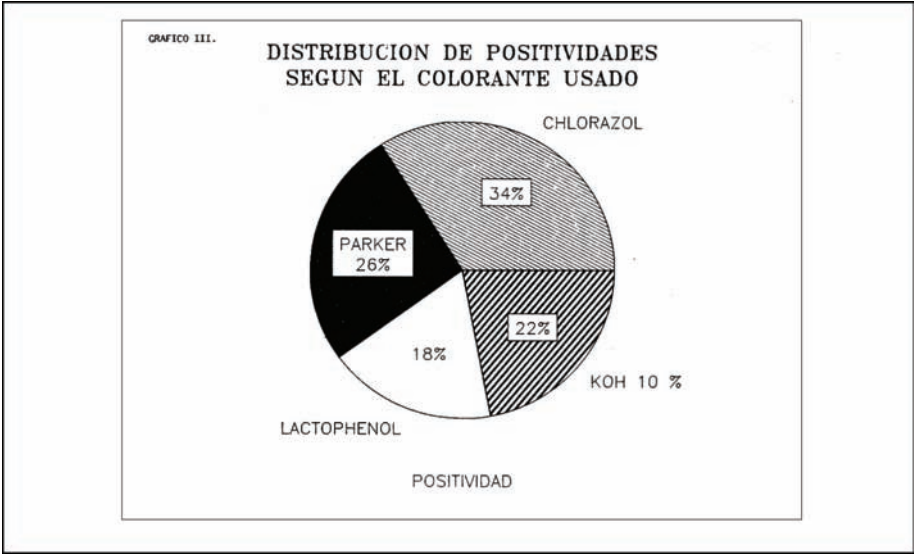


GRAFICO II.

PORCENTAJES DE DIRECTOS  
POSITIVOS Y NEGATIVOS  
EN EXAMENES MICOLOGICOS



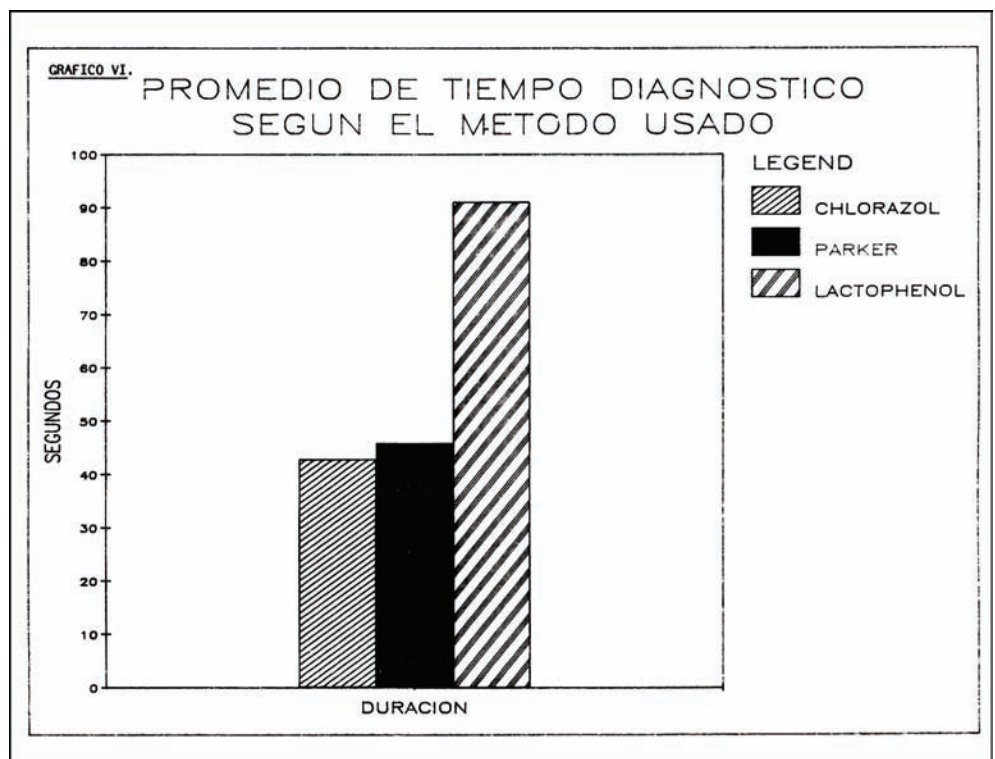
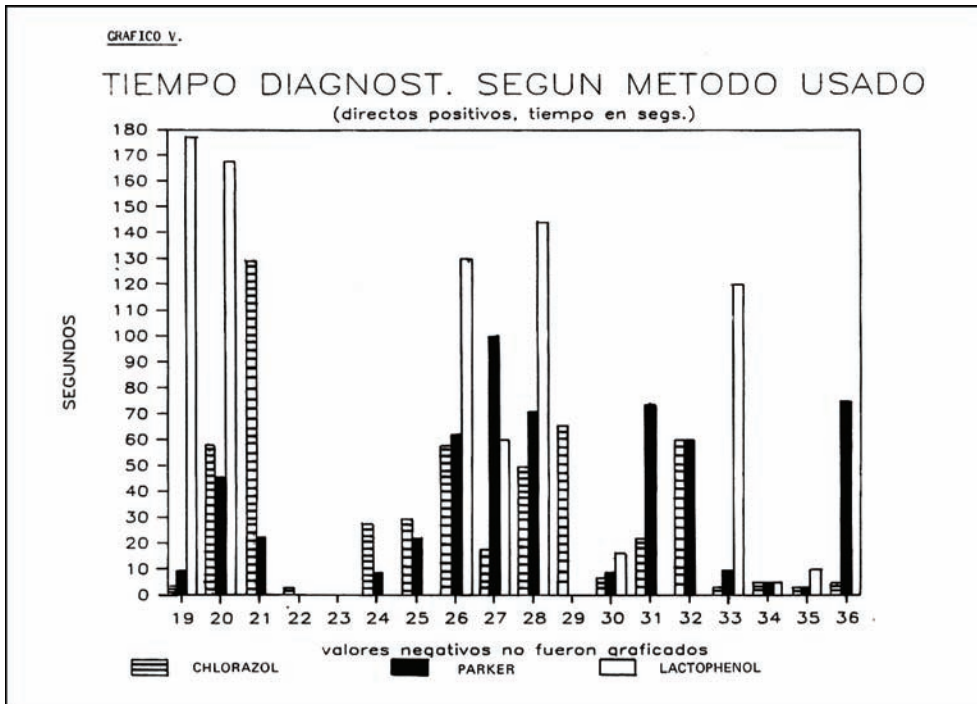


CUADRO V

TIEMPO DIAGNOSTICO SEGUN EL METODO USADO

MUESTRA NUMERO	CHLORAZOL BLACK E	PARKER	LACTOPHENOL
1	6	15	-
2	20	30	180
3	14	39	30
4	27	258	159
5	10	78	-
6	60	-	-
7	90	-	-
8	28	-	-
9	80	-	191
10	5	5	37
11	6	10	100
12	198	-	-
13	-	-	-
14	29	12	10
15	5	13	45
16	180	-	-
17	40	35	60
18	111	120	-
19	4	10	177
20	58	46	168
21	130	23	-
22	3	-	-
23	-	-	-
24	27	9	-
25	30	22	-
26	58	62	130
27	18	100	60
28	50	71	144
29	66	-	-
30	7	9	16
31	22	74	-
32	60	60	-
33	3	10	120
34	5	5	5
35	3	3	10
36	5	75	-
PROM.	42.88	45.92	91.22

NOTA: Exámenes directos positivos.  
Tiempo en segundos.  
- = directo negativo



**COMENTARIOS**

Entre los diferentes colorantes evaluados, el Chlorazol Black E es el único específico de la quitina (8,9), por lo que disminuye el común riesgo de falsos positivos, al confundir como hifas estructuras de mosaicos celulares,

fibras o cristales de KOH.<sup>(10)</sup>

La Tinta azul Parker en solución con KOH y DMSO se mostró bastante efectiva en muestras donde existía abundancia de hifas, en las que no representó ningún problema el diagnóstico incluso con KOH sólo. En las mues-

tras con muy escasas hifas, en especial cuando éstas se encontraban muy dispersas y sobre todo en muestras gruesas, como uñas, fue donde el Chlorazol mostró su mayor efectividad, permitiendo revisar rápidamente la totalidad de la muestra a bajo aumento, hasta lo

calizar las escasas hifas diagnósticas existentes.

En las muestras revisadas de *Tinea capitis* no se encontró gran ventaja en el uso de Chlorazol Black E ya que la existencia de esporas era fácilmente demostrable aun con el KOH solo, sin embargo, el Chlorazol permitió un mejor contraste para la realización de microfotografía.

El DMSO ha sido usado por anteriores autores en combinación con el KOH para aumentar el poder aclarante de este último, con excelentes resultados para la visualización de hifas (3,6). El hecho de añadir el DIVISO a la solución de Tinta Parker + KOH le aumentó considerablemente su efectividad, comparándolo con el uso de la solución de Tinta Parker con KOH sin DMSO.

Pensamos que en el mejoramiento de las soluciones colorantes cumplió un papel trascendental el añadir el DMSO, ya que aceleró el proceso de aclaramiento; esto último es de inapreciable valor, en especial en muestras gruesas, tales como uñas, palmas y plantas en las cuales era necesario un compás de espera hasta obtener un aclaramiento adecuado de la muestra, que incluso llegaba a ser de 24 horas en cámara húmeda, lo que lo hace poco práctico en el manejo cotidiano de una consulta dermatológica.

Es importante hacer notar, que el añadir DMSO al KOH acelera e incrementa de tal forma el poder aclarante, que en muchos casos no fue posible la

observación del material después de un tiempo prolongado, ya que éste se encontraba totalmente disuelto.

También probamos el colorante Chlorazol Black E en la observación de dilacerados de cultivos micológicos, ofreciendo una gran nitidez por la afinidad del colorante con la quitina y su contraste con el fondo grisáceo.

Sugerimos que el Chlorazol Black E pudiese ser útil en la búsqueda en exámenes directos de *Sarcoptes scabiei* o de *Demodex folliculorum*, ya que el exoesqueleto de estos ectoparásitos se encuentra constituido por quitina en su gran mayoría.

Otro aspecto que merece ser resaltado es el excelente contraste que ofrece el Chlorazol Black E para la realización de microfotografías.<sup>(9)</sup>

Consideramos que el mejoramiento de las técnicas clásicas de observación de exámenes directos de pacientes con sospecha clínica de micosis superficiales es de vital importancia no sólo para los dermatólogos, sino también para el médico general a cargo de medicaturas rurales, haciendo que disminuyan en forma importante las confusiones diagnósticas con su consecuente error terapéutico.

#### REFERENCIAS

1. Albornoz, M.; Campins, H.; Briceño M., T.; Santiago, R.; Yarzabal, L.A. Lecciones de Micología Médica. Caracas 1979. p32.

2. Conant, N.; Smith, D.T.; Baker, R.D.; Callaway, J. L.; Martin, D.S. Manual of Clinical Mycology. W.B. Saunders Company. Philadelphia & London. 2nd Ed. 1962. p333.

3. Ajello, L.; Georg, L.K.; Kaplan, W.; Kaufman, L. Laboratory Manual for Medical Mycology. U.S. Department of Health Education, and Welfare. Public Health Service. C.D.C. Atlanta. Georgia 30333. 1966. Appendix 11.

4. Beneke, E.S.; Rogers, A.L. Medical Mycology Manual. 3rd Ed. p29.

5. Albornoz, M.; Campins, H.; Briceño M., T.; Santiago, R.; Yarzabal, L.A. Op-cit p10.

6. Eaglstein, W.; Pariser, D.M. Office Techniques for Diagnosing Skin Disease. Year Book Medical Publishers, INC. Chicago & London. 1978. p10.

7. Da Silva, C. Micología Médica. Ed. Sarvier. 1984. p405.

8. Cannon, H.g.; A new biological stain for general purposes. Nature 1937; 139. p549.

9. Burke, W.A.; Jones, B.E. A simple Stain for Rapid Office Diagnosis of Fungus Infections of the Skin. Arch Dermatol. 120: 1519-1520. 1984

10. Eaglstein, W.; Pariser, D.M. Op-cit p13.

11. Swartz, J.H.; Lamkins, B.E. A Rapid, Simple Stain for Fungi in Skin, Nail Scrapings and Hairs. Arch Dermatol. 89: 89-94. 1964.

12. Fayad Camel. Estadísticas Médicas y de Salud Pública. U.L.A. 1966.

13. Wonnacott, T.H. Introducción a la Estadística. Edit. Limusa. 1979.