

- **Título del Proyecto: “Aislamiento e identificación de levaduras del género *Malassezia* en individuos VIH/SIDA e inmunocompetentes”.**
- Número ID del proyecto: 74
- Área de conocimiento: Micología médica
- Facultad o Servicio: Depto. de Parasitología y Micología. Facultad de Medicina. UdelAR.
- Nombre completo de los-as Integrantes del equipo: Annie Arrillaga, Victoria Cabó, Cecilia Martínez, Tatiana Sellanes.
- Correo electrónico del/de la estudiante referente: anniearrillaga@gmail.com
- Nombre completo del/de la docente orientador-a: Zaida Arteta Dalchiele
- Correo electrónico del/de la docente orientador-a: zaidaarteta@gmail.com

1) Objetivos

Objetivo general:

Determinar la frecuencia y distribución de especies de levaduras del género *Malassezia* comparando dos poblaciones: personas con VIH/SIDA e inmunocompetentes.

Objetivos específicos:

- a. Aislar especies de levaduras del género *Malassezia* en muestras obtenidas de pacientes con VIH/SIDA y población inmunocompetente.
- b. Implementar la técnica de identificación fenotípica de las levaduras del género *Malassezia* en el laboratorio de Micología del Departamento de Parasitología y Micología.
- c. Identificar a nivel de género y especie las levaduras del género *Malassezia* de las muestras obtenidas de pacientes con VIH/SIDA y población inmunocompetente.
- d. Conocer y comparar la prevalencia de cada especie de *Malassezia* en ambas poblaciones.
- e. Comparar la distribución de especies según, región anatómica y nivel inmunitario en ambas poblaciones.

2) Enumere y describa las **principales actividades** desarrolladas en el marco de su proyecto.

1) Puesta a punto de la técnica de identificación:

La puesta a punto consistió en recolectar muestras de voluntarios sanos, realizando los mismos procedimientos que se llevarían a cabo luego con las poblaciones en estudio.

- a. Observación de las muestras al microscopio óptico, consignándose la presencia de levaduras, tamaño, forma y número por campo.
- b. Aislamiento de las colonias en placas de agar Dixon modificado, posteriormente se repicaron en tubos para su conservación.
- c. Pruebas bioquímicas: reacción de catalasa, realización del Tween Test, prueba de termotolerancia en agar Sabouraud a 32°C.

2) Toma de las muestra de las poblaciones en estudio:

Recolección de muestras en población N°1 (estudiantes de medicina) se llevó a cabo con estudiantes que concurren a cursos regulares de la carrera al Instituto de Higiene.

Recolección de muestras en población N°2 (pacientes de la policlínica de Enfermedades Infecto-contagiosas del Instituto de Higiene) las muestras se obtuvieron de individuos VIH positivos.

En ambos casos previo a la recolección de muestras se solicitó el consentimiento informado y se realizó la recolección de datos patronímicos en la planilla desarrollada para tal fin.

Toma de muestra: Se realizó mediante el método de la impronta con cinta adhesiva transparente, colocándose cinta adhesiva en la región frontal y surco nasogeniano.

Luego se realizó un examen directo de la cinta coloreada con azul de metileno al microscopio óptico con aumentos de 200x y 400x consignándose el número promedio de levaduras por campo de 1000x; utilizándose una escala cuantitativa para catalogar a las muestras positivas:

- a. Escasa cantidad de levadura si en el campo se observan de 1- 5,
- b. Moderada cantidad de levadura si en el campo se observan de 5-10
- c. Abundante cantidad de levadura si en el campo se observan >10.

También se consignó su morfología valorando el tamaño, forma, dimensión de la unión al brote y presencia de filamentos.

Cultivo: se efectuó tomando las muestras con hisopo estéril en las regiones anatómicas a estudiar, sembrándolas en placas de Petri con agar Dixon modificado con agregado de cloramfenicol. Se realizó la incubación de las placas en estufa a 32°C, con controles diarios, descartando las placas que no poseían crecimiento a los 14 días.

Identificación y conservación de las levaduras: para la identificación de las colonias aisladas se siguieron los criterios de identificación de especies propuestos por Gueho y colaboradores valorando la morfología y tamaño de las levaduras. Con el fin de estudiar las propiedades fisiológicas se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa por el método convencional y sus requerimientos lipídicos mediante el test de difusión de Tween propuesto por Guillot y cols. Las levaduras una vez identificadas se conservaron en heladera por duplicado en tubos con tapa de rosca.

Análisis de los datos obtenidos: se implementó una base de datos en el programa Excel donde se constataron todas las variables en estudio. Las variables cuantitativas fueron expresadas como media \pm desvío estándar y las cualitativas fueron expresadas en frecuencia absoluta.

3) Indique si **se han efectuado todas las etapas** planteadas en el cronograma de ejecución del proyecto. En caso de que su cronograma haya sufrido alteraciones o no se haya podido cumplir con todas las etapas definidas en el cronograma, aclare los motivos de tal situación.

Se pudieron efectuar todas las etapas planteadas en el cronograma, sin embargo no con el límite de tiempo que se había establecido por lo que se solicitó la prórroga.

La puesta a punto del Tween Test, técnica fundamental para la identificación de las levaduras, implicó tomar un mayor tiempo del especificado en el cronograma previamente pautado; debido a las dificultades que se estipulan en el ítem N°6. Esta etapa se efectuó desde abril a principios de noviembre del 2015. De esta manera se superpuso con la etapa de recolección de muestras (la cual comenzó en el mes de agosto para la población N°1, finalizando en octubre) y con el comienzo de la recolección de muestras de la población N°2 (etapa que finalizó a mediados de enero del 2016).

La última etapa de análisis de los datos obtenidos se realizó al finalizar las anteriores.

4) *Indique los principales resultados obtenidos.*

Se estudiaron un total de 40 estudiantes de medicina, 32 mujeres y 8 varones; con edades comprendidas entre los 19 y 25 años, siendo el promedio de edad de 22 años ($\pm 4,27$). Dos estudiantes presentaban dermatitis seborreica al momento del estudio, sin tratamiento previo. Un estudiante se encontraba en tratamiento con corticoides vía oral por una patología respiratoria.

En el grupo de individuos VIH+ se estudiaron 40 pacientes, 19 mujeres y 21 hombres con edades comprendidas entre los 21 y 54 años, siendo el promedio de edad 41,5 años ($\pm 10,69$). Tres individuos presentaban Pitiriasis Versicolor al momento del estudio y dos de ellos Dermatitis Seborreica de rostro, ambos sin tratamiento. Todos los individuos menos uno se encontraban en tratamiento antirretroviral, la carga viral de 37 pacientes era indetectable, 3 pacientes se encontraban en un nivel detectable,

De cada población se obtuvieron 80 cintas adhesivas y 80 cultivos, constituyendo un total de 160 muestras de cada población.

Dado que el examen micológico consta de directos y cultivos se toma como unidad las muestras obtenidas de directo y cultivo.

139 (86,8%) de los 160 estudios realizados a ambas poblaciones son positivos correspondiendo: 20 (27,8%) con micológico directo y cultivo positivo y 119 (85,6%) en las que el examen directo fue positivo pero no se logró el aislamiento de la levadura en los cultivos.

Estudio directo: se observaron al microscopio óptico 160 cintas adhesivas teñidas con azul de metileno correspondientes a ambas poblaciones en estudio.

Estudiantes de medicina (n=40): de la región frontal se obtuvieron 8/40 (20%) muestras negativas, y 32/40 (80%) muestras positivas, de las cuales: 21 escasa cantidad; 4 moderada cantidad y 7 abundante cantidad. En las muestras provenientes del surco nasogeniano se encontraron 2/40 (5%) negativas y 38/40 (95%) positivas, dentro de las cuales 19 escasa cantidad, 7 moderada cantidad y 12 abundante cantidad. En una muestra de región frontal se observaron filamentos.

Pacientes VIH+ (n=40): de la región frontal se obtuvieron 8/40 (20 %) muestras negativas, 32/40 (80%) muestras positivas, de las cuales 19 poseían escasas cantidad, 5 moderada cantidad y 8 abundante cantidad. En el surco nasogeniano se observaron 3/40 muestras negativas, 37/40 muestras positivas dentro de las cuales se caracterizan 21 escasa; 9 moderada y 7 abundante.

Cultivos: De un total de 160 muestras sembradas en agar Dixon Modificado, provenientes de 80 individuos (40 individuos sanos, 40 VIH+) se obtuvieron 20 aislamientos (12,5%) de *Malassezia spp*. Todos los aislamientos corresponden a muestras positivas al examen directo.

Estudiantes de medicina: se aislaron 18 cepas, encontrándose 2 especies: *M. dermatis* (16), *M. japonica* (2). De los aislamientos, 9 corresponden a la región frontal y 9 al surco nasogeniano.

Pacientes VIH+: se obtuvieron 2 aislamientos de *Malassezia spp*, ambos correspondieron a *Malassezia dermatis* y fueron provenientes del surco nasogeniano.

No se encontró en las muestras obtenidas asociación entre más de una especie. Se observó asimismo el desarrollo de otros microorganismos como: bacterias y otras levaduras *Candida spp*, *Trichosporon spp* y *Rhodotorula spp*.

El porcentaje de aislamientos en cultivos en este estudio, es similar al de otros estudios de la región realizados en individuos sanos con muestras provenientes de rostro.

La prevalencia de levaduras en los exámenes directos de ambas poblaciones es similar. El alto nivel de exámenes directos positivos remarca la presencia de levaduras del género *Malassezia* como flora normal de la piel.

En relación al predominio de aislamientos en la población estudiantil creemos, se debe a una mayor actividad de las glándulas sebáceas entre los 18 y 25 años de edad; lo que está ampliamente documentado.

Vinculado a esto existieron diferencias en la distribución por edades, se destaca que el promedio de edad en la población de estudiantes (22 años $\pm 4,27$) fue menor que en el grupo de individuos VIH+ (41,5 años $\pm 10,69$)

La especie aislada en individuos VIH coincide con la especie más frecuentemente aislada en población estudiantil. Se necesitaría un mayor número de estudios para corroborar diferencias entre aislamientos de especies.

Se consideran de importancia otros estudios en otras poblaciones, en piel sana y enferma, diversos grupos etáreos y regiones corporales, con el fin de poder conocer la epidemiología y el potencial patógeno de las especies de levaduras del género *Malassezia* en Uruguay.

5) Indique si los resultados parciales o finales del proyecto fueron difundidos a través de alguna actividad (charlas, seminarios, talleres, prensa, edición de materiales impresos, etc.).

La metodología y resultados del estudio se difundieron en reuniones de cátedra del Dpto de Parasitología y Micología con el resto del equipo docente y de otros especialistas que concurren a la misma.

6) En caso de haber enfrentado dificultades en el desarrollo del proyecto de investigación, realice una breve descripción de las mismas.

Existieron diversas dificultades técnicas para la puesta a punto de la identificación de las levaduras:

En lo previo: relacionados al proceso de adquisición de los materiales a utilizar ya que existen plazos extensos desde la cotización de los materiales hasta su llegada al Dpto.

En relación a la recolección de las muestras también se dieron dificultades vinculadas fundamentalmente a los horarios de la policlínica de Enfermedades Infecciosas y el tiempo disponible de las estudiantes, así como licencias por parte del equipo de salud, etc.

Durante: dificultades vinculadas al proceso de adquisición de habilidades-destrezas en la manipulación de los materiales y para el trabajo de mesada: el hecho de trabajar con placas, así como las condiciones locales (laboratorio en reparación) favorecieron la contaminación y necesidad de repetición de las pruebas.

Estas circunstancias determinaron que debieramos tomar la decisión de bajar el número total (n) de las poblaciones a estudiar, de 60 individuos en cada población a 40.

En cuanto a dificultades vinculadas a la identificación de las levaduras, se utilizó el aceite de ricino identificado en la bibliografía con la finalidad de diferenciar dos especies: *M. furfur* de *M. dermatis* según la asimilación del mismo o no. Sin embargo no contamos con un control positivo para poder validar la técnica; no se pudo comparar la cepa de referencia lo que quedará pendiente a futuro.

7) En base a su experiencia de trabajo en equipo en el marco de este Programa, le solicitamos que realice sugerencias o comentarios para ser tomados en cuenta en futuras ediciones del mismo.

En la Facultad de Medicina se desarrolla todos los años el curso de Metodología Científica II en el cual los estudiantes que se encuentran cursando el 6° año de la carrera pueden realizar un trabajo de investigación. El hecho de haber realizado antes un proyecto PAIE aporta a los estudiantes herramientas para el desarrollo de investigaciones futuras o la continuación de otros proyectos.

Los tiempos de las compras dentro del año que se determina para la realización del proyecto pueden retrasar el inicio de la etapa experimental, por lo que creemos que para desarrollarlo en un año debería acreditarse el dinero algunos meses antes para poder iniciar con todos los materiales la etapa experimental.

8) Resumen:

“Aislamiento e identificación de levaduras del género *Malassezia* en individuos VIH/SIDA e inmunocompetentes”

Estudiantes: Annie Arrillaga Victoria Cabó, Cecilia Martínez, Tatiana Sellanes.

Docente orientador: Prof. Agda. Dra. Zaida Arteta

Docente co-orientador: Prof. Adj Patricia Perera

Servicio: Depto. de Parasitología y Micología. Facultad de Medicina. UdelaR.

Las levaduras del género *Malassezia* se consideran patógenos oportunistas causantes de diversas afecciones dermatológicas. La prevalencia de afecciones por estas levaduras varía en distintas regiones del mundo según el clima local o en regiones anatómicas de un mismo hospedero. No se ha podido aclarar completamente el rol patógeno de ellas y su relación con el estado de inmunosupresión.

El objetivo del presente estudio es caracterizar y comparar la distribución de especies de levaduras del género *Malassezia* en pacientes con VIH/SIDA e inmunocompetentes.

Se estudiaron 80 individuos subdivididos en dos poblaciones, VIH-SIDA e inmunocompetentes. Se tomaron muestras para examen micológico directo (mediante la técnica de cinta adhesiva transparente) y cultivos (realizando hisopado) ambas del surco nasogeniano y frente. Las colonias se identificaron en base a criterios macro y microscópicos y a test fisiológicos como prueba de la catalasa y requerimientos lipídicos: Tween 20, 40, 60 y 80.

Se recolectaron 160 cintas adhesivas para examen directo y 160 cultivos constituyendo un total de 320 muestras provenientes de ambas poblaciones.

Se evidenció la presencia de levaduras del género *Malassezia* en 305 muestras (95,3 %) por análisis microscópico directo y 20 (6,25%) se aislaron por cultivo. Correspondiendo 18 de ellos a *M. dermatitis* y 2 de ellos a *M. japonica*. Esta distribución es similar a estudios de otros autores. El bajo número de aislamientos en cultivo con respecto a las muestras positivas puede explicarse por la técnica de recolección de la muestra, o el medio utilizado para su aislamiento inicial el cual no garantiza el crecimiento de todas las especies por igual.

El bajo número de aislamientos en personas con VIH puede explicarse además por la franja etaria mayor en este grupo.

9) Gastos

Cantidad	Ítem-descripción
1000	pipetas Pasteur de 3.0ml estériles \$ 2.324,00
1	Refrigerador: 165L, Freezer 63L, 159x54xprof.64cm \$ 12.821,71
10	Resmas papel Fanacopy A4 x 500 75G \$ 1.183,40
40	Portaobjeto comun Deltalab 76x26mm c/banda p/rotular caja x 50 \$3.416,00
3	Cubre objetos de 24x24 mm Deltalab caja x 200 \$ 358,68
50	Tubo ensayo 17x98mm Assistent Vidrio c/ tapa rosca \$ 1.464,00
1	toner Samsung 101S P/ML-2165W/21166-940 \$2519

No se compraron artículos de bibliografía.



.....
FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

Comentarios del docente orientador:

El grupo de estudiantes y en particular la Br. Annie Arrillaga trabajo con destacada responsabilidad y dedicación en el proyecto, han logrado poner a punto la técnica que no se realizaba en nuestro laboratorio y se han encargado de todos los aspectos relacionados con la concreción del proyecto.

Los resultados obtenidos son excelentes desde el punto de vista del aporte al conocimiento en el medio dado que no existían hasta el momento datos nacionales de identificación de estas levaduras, sin embargo es de destacar el bajo número de aislamientos en cultivos. Esto último puede explicarse por la técnica utilizada para la recolección de las muestras lo cual será objeto de análisis y mejora en etapas posteriores.

pensamos que es fundamental completar el trabajo con un mayor número de muestras y mejora en la toma de la muestra para cultivo.



.....
FIRMA DEL DOCENTE ORIENTADOR