

EVALUACION DE CUATRO MEDIOS SELECTIVOS PARA AISLAMIENTO DE HONGOS PATOGENOS

L. SANTAMARIA, M.L. ESCOBAR, L.H. MONCADA, G. GUZMAN, F. MONTOYA

Se evaluaron cuatro medios de cultivo comerciales para el aislamiento de hongos patógenos que contienen agar, peptona, glucosa, cicloheximida y cloranfenicol. En cada uno se determinó la frecuencia de aislamiento de hongos patógenos así como sus características morfológicas, su tiempo de crecimiento y la rapidez e intensidad de la contaminación bacteriana y/o micótica, con el objeto de puntualizar diferencias entre ellos. Se estudiaron 100 muestras de casos con sospecha clínica de dermatomycosis o micosis subcutáneas y 50 de pacientes con diagnóstico presuntivo de micosis profunda. Se aislaron 56 patógenos en el primer grupo y *P. Brasiliensis* en tres esputos seriados.

INTRODUCCION

Los hongos, a diferencia de las bacterias, son nutricionalmente poco exigentes; de ahí que los medios que se utilizan de rutina para su aislamiento sean escasos. A finales del siglo XIX, Raymond Sabouraud describió la fórmula del medio de cultivo que lleva su nombre y que se ha considerado de uso universal en micología (1). Más tarde se vio la necesidad de un medio selectivo que frenara la contaminación por flora microbiana pero que permitiera el crecimiento de los hongos patógenos Georgen en 1953 (2) y McDonough en 1960 (3) propusieron adicionar antibióticos, cicloheximida y cloranfenicol, los cuales resultaron muy útiles para controlar la contaminación.

En Colombia cuatro casas comerciales suministran a los laboratorios de micología sendos medios selectivos que contienen agar, peptona, glucosa, cicloheximida y cloranfenicol. De acuerdo a esta composición deberían comportarse en forma similar en su capacidad de aislamiento de hongos patógenos. Sin embargo el uso rutinario de estos diversos medios ha permitido observar diferencias importantes entre uno y otro.

Es el objetivo de este trabajo tratar de puntualizar esas diferencias para así definir cuál o cuáles son los mejores medios que permitan un trabajo idóneo en el laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron simultáneamente los medios "Selective Agar for Pathogenic Fungi" de la Casa Merck, "Dermasel" de Oxoid, "Micosel Agar" de la firma BBL y "Mycobiotic Agar" de Laboratorios Difco. La preparación de los medios se hizo de acuerdo a las instrucciones de cada una de las casas productoras.

Se estudiaron 100 muestras de casos con sospecha clínica de dermatomycosis o micosis subcutáneas y 50 de pacientes con diagnóstico presuntivo de micosis profunda. Se incluyeron sólo aquellos pacientes que llevaban un mínimo de cinco días sin tratamiento antimicótico. Las muestras recolectadas fueron pelos, escamas, esputos, biopsias, líquidos y exudados. Para la recolección de las muestras se emplearon materiales y recipientes estériles.

A continuación se procedió a sembrar en cada uno de los medios, y se numeraron según el siguiente esquema: 1. Selective Agar for Pathogenic Fungi, 2. Dermasel Agar, 3. Micosel Agar, 4. Mycobiotic Agar.

Cada muestra se sembró en los cuatro medios y se rotó el orden de siembra, de tal foma que cada uno tuviera la misma oportu-

Licenciadas Lucía Santamaría, Martha Lucía Escobar, Luz Helena Moncada, Gisela Guzmán, Dr. Fernando Montoya: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.

Solicitud de separatas a la Licenciada Lucía Santamaría.

nidad de ser sembrado en primero, segundo, tercero o cuarto lugar.

En promedio se hicieron 5 inóculos en cada medio, en forma radial, siguiendo las manecillas del reloj. En el caso de muestras de uñas se hicieron 10 inóculos en cada medio. De muestras líquidas se sembraron 0.1 ml en cada caja.

En cada uno de los medios inoculados se determinó lo siguiente: 1. La frecuencia de aislamiento de hongos patógenos. 2. El número de colonias de dichos hongos. 3. Las características macro y microscópicas de esas colonias. 4. El tiempo requerido para el crecimiento. 5. El grado de contaminación bacteriana y/o micótica.

En los casos de micosis superficiales e intermedias se hizo seguimiento de los cultivos durante tres semanas, con cinco lecturas semanales. En el caso de micosis profundas se hicieron dos lecturas semanales por cinco semanas. Tanto en las muestras de casos con micosis superficiales, como intermedias y profundas, se anotó el día de iniciación del crecimiento del hongo patógeno, se estableció el número de colonias por caja y se determinó el día en que la colonia presentó características típicas en cuanto a morfología, pigmento y esporulación (4). Toda la información anterior se consignó en protocolos de laboratorio especialmente diseñados para esta investigación.

La identificación microscópica se hizo a partir de la colonia por examen directo con azul de lactofenol; si esto no era suficiente se recurrió a métodos especiales de esporulación, microcultivos, pruebas nutricionales o bioquímicas (4, 5).

En cada uno de los medios se estableció el grado de contaminación micótica y/o bacteriana y se leyó de acuerdo al siguiente esquema:

Para los análisis de significancia estadística se utilizó la prueba de chi-cuadrado y para su

- Negativo : Sin ningún tipo de contaminación
 + : Contaminación muy escasa
 ++ : Contaminación moderada que no dificulta la lectura
 +++ : Contaminación abundante que dificulta la lectura
 ++++ : Contaminación total que exige repetición de la muestra

ejecución se contó con un computador Apple II Plus y el respectivo paquete de programas específicos.

RESULTADOS

Las 150 muestras estudiadas fueron tanto de pacientes de instituciones oficiales como remitidos por médicos* particulares. En los pacientes con sospecha de micosis superficial sobresalieron las mujeres mayores de 14 años, en cambio en los casos con sospecha de micosis profunda predominaron los varones adultos. Sólo nos remitieron 17 menores de 14 años, con presunta micosis superficial. En los casos con probable micosis sistemática, 40 muestras fueron de sitios relacionados con tracto respiratorio (biopsia de laringe, exudado de lesión en lengua, lavados bronquiales y esputos) y 10 de sitios normalmente estériles (líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido peritoneal y biopsia hepática). De esas muestras las más frecuentes fueron esputos y líquidos cefalorraquídeos.

Micosis superficiales e intermedias: Se aislaron 56 patógenos de las 100 muestra señalizadas para agentes de micosis superficiales o subcutáneas. En la Tabla 1 se muestra su distribución de acuerdo al medio de cultivo utilizado.

Tabla 1. Distribución de 56 hongos patógenos aislados a partir de 100 muestras de piel o mucosas en cuatro medios comerciales, selectivos para hongos patógenos.

Hongo aislado	Frecuencia de aislamiento según el medio			
	1	2	3	4
Dermatofitos	30	26	30	29
Candida spp.	19	19	14	19
Geotrichum spp.	2	—	1	—
S. schenckii	1	1	1	1
Trichosporum spp.	1	1	1	1
Total	53	47	47	50

En su orden, los dermatofitos y las Cándidas fueron los patógenos más frecuentes. En forma ocasional se aislaron *Geotrichum spp.* y *S.*

schenkii. Sólo en cuatro pacientes se tuvieron aislamientos múltiples. Los medios 1 y 4 permitieron la mayor recuperación de patógenos, sin embargo no hubo diferencias significativas.

Los medios 1 y 3 fueron los más sensibles para el aislamiento de dermatofitos y el medio 3 el menos adecuado para el aislamiento de levaduras.

El número de colonias de dermatofitos aislados por caja osciló en promedio entre un mínimo de 2 y un máximo de 10. El dermatofito con el menor promedio fue el *T. mentagrophytes* y el de mayor, el *M. canis*. No hubo diferencias significativas atribuibles a los varios medios comparados. No resultó de utilidad la cuantificación de las colonias de levaduras ya que su crecimiento, en la mayoría de los casos, fue muy abundante y de difícil recuento.

Con relación a las características macroscópicas del crecimiento en el medio 4 no se observaron colonias atípicas de dermatofitos; el medio 2 permitió el crecimiento de la mayor cantidad de colonias atípicas ($p < 0.05$); en los medios 1 y 3 la frecuencia de colonias atípicas fue 10%; en comparación con la frecuencia en los medios 2 y 4 la diferencia fue significativa ($p < 0.05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de aislamiento de colonias atípicas de dermatofitos en cuatro medios comerciales, selectivos para hongos patógenos.

Medio utilizado	Frecuencia de aislamientos		
	No.	%	Total
1	3	10.0	30
2	7	26.9	26
3	3	10.0	30
4	0	0.0	29

Se aislaron cuatro especies de dermatofitos (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *E. floccosum* y *M. canis*); la Tabla 3 muestra que el medio 1 fue el más adecuado para aislar el *T. mentagrophytes*; el 1 y el 4 lo fueron para el *E. floccosum*; el 2 y el 3 para el *T. rubrum*; los cuatro medios se comportaron igual frente al *M. canis*; las diferencias no fueron significativas.

Tabla 3. Frecuencia de aislamiento de las diferentes especies de dermatofitos dependiendo del medio utilizado.

Medio utilizado	Especie de dermatofito (%)			
	<i>T. mentagrophytes</i> (11 aislamientos)	<i>E. floccosum</i> (10 aislamientos)	<i>T. rubrum</i> (9 aislamientos)	<i>M. canis</i> (4 aislamientos)
1	81.8	100	77.8	100
2	45.5	80	100	100
3	72.7	90	100	100
4	72.7	100	77.8	100

En el medio 2 se obtuvo el crecimiento más rápido de levaduras y en el 3 el de dermatofitos; los medios 1 y 2 dieron el crecimiento más lento de levaduras y dermatofitos, respectivamente; las diferencias en la velocidad del crecimiento no fueron significativas; el tiempo de crecimiento de los dermatofitos fluctuó entre 3 y 14 días y el de las levaduras entre 2 y 14 (Tabla 4).

Tabla 4. Tiempo de crecimiento promedio de dermatofitos y levaduras en cuatro medios comerciales, selectivos para hongos patógenos.

Tipo de hongo	Tiempo de crecimiento según el medio (días)			
	1	2	3	4
Dermatofito	6.8	7.4	6.2	6.4
Levadura	7.4	5.8	6.6	6.5

No hubo diferencias significativas en la intensidad de la contaminación microbiana de los cuatro medios; en general no dificultó la lectura de los cultivos; tampoco la hubo en la rapidez con que se desarrollaron los contaminantes; la frecuencia de contaminación de las muestras de piel y anexos osciló entre 58.3 y 78.0% (Tabla 5) y no mostró diferencias significativas entre uno y otro medio; el momento en que apareció la contaminación fluctuó, en el medio 1, entre 6 y 11 días.

Tabla 5. Frecuencia de contaminación bacteriana y/o micótica en cuatro medios selectivos para hongos patógenos inoculados con muestras tegumentarias.

Tipo de contaminación	Medio utilizado Frecuencia observada (%)			
	1	2	3	4
Bacteriana sola	28	28.3	43.2	33.3
Micótica sola	22	23.0	11.4	8.3
Mixta	28	15.2	18.2	16.7
Total	78.0	66.5	72.7	58.3

Micosis profundas. Básicamente se aisló un agente de micosis profundas en tres oportunidades (*Paracoccidioides brasiliensis*). De las tres muestras positivas, no se aisló el agente en el medio 1. Sólo en dos de ellas se cultivó en el medio 2 y en las tres muestras se recuperó el *P. brasiliensis* en los medios 3 y 4. La morfología del microorganismo fue típica en los tres medios donde logró crecer.

El tiempo de crecimiento fue de 16 días en todos los medios. Las diferentes estructuras microscópicas de este patógeno se observaron de mayor tamaño en el medio 2.

En tres de los medios el 100% de las muestras procedentes del tracto respiratorio

Tabla 6. Frecuencia de contaminación bacteriana y/o micótica en cuatro medios selectivos para hongos patógenos inoculados con muestras procedentes del tracto respiratorio.

Tipo de contaminación	Medio utilizado Frecuencia observada (%)			
	1	2	3	4
Bacteriana sola	12.5	20.0	17.5	15.0
Micótica sola	32.5	32.5	27.5	32.5
Mixta	55.0	47.5	52.5	52.5
Ninguna	0.0	0.0	2.5	0.0
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

presentaba algún grado de contaminación; ésta fue tanto bacteriana como micótica con predominio de la mixta (bacterias y hongos); no hubo diferencias significativas con respecto a la rapidez o a la intensidad de la contaminación y ésta fue siempre escasa o moderada de

modo que no interfirió la lectura de los cultivos (Tabla 6). Las muestras de sitios normalmente estériles se contaminaron entre un 30% (medio 4) y un 60% (medio 1); en ningún caso hubo contaminación bacteriana sola; la menor frecuencia de contaminación se dio con las muestras del LCR; el grado de contaminación, que fue moderado, no interfirió lecturas (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de contaminación bacteriana y/o micótica en cuatro medios selectivos para hongos patógenos inoculados con muestras procedentes de sitios normalmente estériles.

Tipo de contaminación	Medio utilizado Frecuencia observada (%)			
	1	2	3	4
Bacteriana sola	—	—	—	—
Micótica sola	50	30	40	20
Mixta	10	10	10	10
Ninguna	40	60	50	70
Total	60	40	50	30

DISCUSION

Es de resaltar que la única característica en la cual se demostraron diferencias significativas entre los cuatro medios ensayados fue la referente a la tipicidad de las colonias de los dermatofitos aislados. En el medio 2 se cultivó el mayor número de dermatofitos con morfología atípica, lo que dificultó su identificación. Se observó además, que en este medio los dermatofitos crecen más lentamente; el *T. mentagrophytes* se aisló con menor frecuencia que en los otros medios. También fue menos útil para el aislamiento de *P. brasiliensis* que los medios 3 y 4 pero mejor que el 1. Por lo anterior no recomendamos el medio 2 para aislamiento micológico ni para docencia.

Con respecto a los demás medios, aunque no se presentaron diferencias significativas, vale la pena subrayar algunas tendencias. El medio 1 fue el que se contaminó más frecuentemente y no fue útil para el aislamiento de *P. brasiliensis*. En el medio 3 se recobró el menor número de levaduras. El medio 4 resultó ser el más idóneo y no presentó ninguno de los inconvenientes señalados.

Es preciso mencionar la alta tasa de contaminación (30-100% de los cultivos), tanto de muestras de sitios con flora corporal como de las de sitios normalmente estériles; ello obligará a refinar los métodos de toma y transporte de las muestras que, según nuestra experiencia, son los dos factores más implicados en la contaminación.

No podemos sacar conclusiones válidas con respecto a las muestras de micosis profundas debido al mínimo aislamiento de patógenos. Dado que el tiempo de crecimiento máximo para levaduras y dermatofitos fue de 14 días, recomendamos reevaluar la práctica corriente de esperar tres semanas para dar el resultado definitivo de los cultivos de agentes de dermatomycosis.

SUMMARY

Four commercial culture media with similar composition (Selective Agar for Pathogenic Fungi, Dermasel Agar, Micosel Agar and Mycobiotic Agar) were evaluated for isolation of pathogenic fungi. One hundred samples of cases suspicious of dermatomycosis or subcu-

taneous mycosis and 50 of patients with presumptive diagnosis of systemic mycosis were studied. The Mycobiotic Agar was the best of the four media for the isolation of dermatophytes. On Dermasel Agar the growth time was longer, the morphology of the colonies was atypical and *T. mentagrophytes* was frequently undetected. Micosel Agar was not adequate for *Candida spp.*

No valid results were obtained for systemic fungi due to the low number of isolates.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- RIPPON JW. Medical Mycology. The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes. Appendix, 1974; 545.
- 2.- GEORG LK. Use of cicloheximide medium for isolation of dermatophytes from clinical. Arch Dermat-Syphil 1953; 63: 355-361.
- 3.- McDONOUGH ES, et al. Growth of dimorphic human pathogenic fungi on media containing cycloheximida and cloramphenicol. Mycopath Mycol Appl 1960; 13: 113-120.
- 4.- REBELL G, TAPLIN D. Dermatophytes: Their recognition and identification. 2 ed. Coral Gables, Fla. U. of Miami Press; 1970.
- 5.- LANGERON, M., MILOCHEVITCH, S. Morphologie des dermatophytes. Ann Parasitol Hum Comp 1930; 8: 46 5-508.