
El medio de Kaminski adicionado con nistatina para el aislamiento de dermatofitos y otros hongos patógenos

HERTA VELEZ, LUCIA SANTAMARIA, FERNANDO MONTOYA

Se evaluaron 3 medios de cultivo de composición diferente (Mycobiotic agar, agar de Kaminski y agar de Kaminski adicionado con nistatina) para el aislamiento de dermatofitos y el reaislamiento de *S. schenckii* y hongos negros, agentes de cromomicosis. Con el objeto de puntualizar diferencias entre dichos medios se determinaron, para cada uno, la frecuencia de aislamiento de los hongos, sus características morfológicas y su tiempo de crecimiento, así como la rapidez e intensidad de la contaminación bacteriana y/o micótica. Se estudiaron 150 muestras de pacientes con sospecha clínica de dermatofitosis y se hicieron 30 reaislamientos de *S. schenckii* y 10 de agentes de cromomicosis.

Se demostró la utilidad del agar de Kaminski modificado, tanto para el aislamiento como para el reaislamiento de los agentes señalados, a pesar de su mayor índice de contaminación microbiana. Fue, además, útil para el aislamiento de levaduras del género *Candida*.

PALABRAS CLAVES

MEDIOS SELECTIVOS PARA HONGOS
MYCOBIOTIC AGAR
MEDIO DE KAMINSKI
MEDIO DE KAMINSKI MODIFICADO

DERMATOFITOS

S. SCHENCKII

INTRODUCCION

Los hongos, a diferencia de las bacterias, son nutricionalmente poco exigentes; de ahí que los medios que se utilizan ordinariamente 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, desde entonces, ha sido usado universalmente en micología (1). Posteriormente se vio la necesidad de un medio selectivo que inhibiera la contaminación microbiana pero permitiera el crecimiento de los hongos patógenos. Georg en 1953 (2) y McDonough en 1960 (3) propusieron adicionar al medio cicloheximida, cloranfenicol y otros antibióticos; esta innovación fue muy útil para controlar la contaminación bacteriana y micótica proveniente del ambiente.

LICS. HERTA VELEZ y LUCIA SANTAMARIA y DR. FERNANDO MONTOYA, Profesores, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Recientemente Santamaría y col (4) demostraron que de los diferentes medios selectivos que se consiguen comercialmente en Colombia y que tienen una formulación casi idéntica el Mycobiotic Agar es el más apto para el aislamiento de dermatofitos. Sin embargo, debido a problemas de suministro, se decidió probar el Medio de Lactrimel introducido por Borelli en Venezuela desde 1962 (5) y modificado por Kaminski en 1972 (6) mediante la adición de cicloheximida, gentamicina y cloranfenicol. Se trata de un medio de fácil preparación, económico y que brinda facilidades para la identificación de los dermatofitos porque permite un excelente desarrollo de pigmento y esporulación, factores determinantes en la identificación de estos microorganismos.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con el medio de Lactrimel encontramos dificultades para la consecución del antimicótico cicloheximida por su difícil importación y sus altos costos; es una sustancia que exige, además, manipulación cuidadosa por el peligro de carcinogénesis.

Para tratar de obviar lo anterior se decidió probar la nistatina como antimicótico sustituto de la cicloheximida, con las ventajas de su disponibilidad comercial y sus costos reducidos. Ensayos preliminares brindaron aislamientos adecuados de dermatofitos, *S. schenkii* y agentes de cromomycosis, lo que nos indujo a tratar de corroborar estos hallazgos en forma sistemática.

En esta publicación se describe la eficacia del medio de Kaminski, modificado mediante la adición de nistatina en reemplazo de la cicloheximida; se lo comparó con los medios de Kaminski convencional y Mycobiotic agar, para el aislamiento primario de dermatofitos y el reaislamiento de *S. schenckii* y algunos hongos dematiáceos agentes de cromomycosis.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron simultáneamente los medios selectivos de Kaminski, Kaminski modificado y Mycobiotic Agar.

La preparación del Mycobiotic Agar se hizo de acuerdo a las instrucciones de la casa productora ;

el medio de Kaminski se preparó de conformidad con las indicaciones del autor (6) y el de Kaminski modificado igual al anterior pero sin agregar gentamicina y reemplazando la cicloheximida por NISTATINA en la proporción de 1 ml (100.000 unidades de nistatina) por litro de medio. La nistatina se agregó al medio esterilizado en autoclave y enfriado a una temperatura de 40-50°C.

Se estudiaron 150 muestras de pelo o escamas de pacientes con sospecha clínica de dermatofitosis; se incluyeron sólo pacientes con un mínimo de 5 días sin tratamiento antimicótico. Para la recolección de las muestras se usaron material y recipientes estériles. Luego se procedió a sembrarlas en cada uno de los medios en estudio, los cuales se numeraron conforme al siguiente esquema:

1. Mycobiotic Agar
2. Agar Kaminski
3. Agar Kaminski modificado

Cada muestra se sembró en los tres medios, pero se rotó el orden de siembra, de tal forma que cada uno tuviera la misma oportunidad de ser sembrado en primero, segundo o tercer lugar.

Para la rotación en el orden de siembra nos ceñimos al siguiente esquema:

- Muestra # 1: 1-2-3
- Muestra # 2: 2-3-1
- Muestra # 3: 3-2-1
- Muestra # 4: 1-3-2
- Muestra # 5: 2-1-3
- Muestra # 6: 3-1-2
- Muestra # 7: Igual a la # 1 y así sucesivamente.

Además de las muestras de pacientes se trabajó con 30 cepas de *S. schenkii* y 10 de hongos dematiáceos causantes de cromomycosis

Técnica de Inoculación

1. Aislamiento primario

De las muestras de pelos y escamas se hicieron 5 inóculos en cada medio, en forma radial, siguiendo las manecillas del reloj.

De las de uñas se hicieron 10 inóculos en cada medio.

Selective Agar for Pathogenic Fungi de Merck; Dermasel de Oxoid; Mycosel Agar de BBL y Mycobiotic Agar de Difco
Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.
Micostatin de Squibb en suspensión,

Los cultivos fueron seguidos durante tres semanas, con 5 lecturas semanales. Se anotó el día de iniciación del crecimiento del dermatofito y se determinó el número de colonias por caja y el día en que la colonia presentó características típicas en cuanto a morfología, pigmento y esporulación (7).

La identificación microscópica se hizo a partir de la colonia, por examen directo con azul de lactofenol; si lo anterior no era suficiente se recurría a métodos especiales de esporulación como microcultivos y a pruebas nutricionales o bioquímicas (8,9).

En cada uno de los medios se estableció el grado de contaminación micótica y/o bacteriana en la forma siguiente:

Negativa: sin contaminación.

+: contaminación muy escasa.

++: contaminación moderada que no dificultaba la lectura.

+++ : contaminación abundante que dificultaba la lectura.

++++ : contaminación total que exigía repetición de la muestra.

2. Reislamientos

A. S. schenckii

Las cepas del hongo se revirtieron a la fase de levadura. Seguidamente se preparó un inóculo en solución salina estéril al 0.85%, a una concentración de 1000 levaduras/ ml. Se hicieron 5 inóculos en cada medio, en forma radial, con bisturí, tal como se había hecho con las muestras de pacientes.

B. Hongos dematiáceos

Se utilizaron cepas de cuatro hongos dematiáceos (*Fonsecae pedrosoi*, *Cladosporium carrionii*, *Phaeoannellomyces werneckii*, y *Phialophora gougertii*) que habían crecido 15 a 20 días. Con un bisturí se desprendieron esporas e hifas de las estructuras más superficiales y se procedió al inóculo de los medios en forma radial. Al igual que con los dermatofitos se hicieron 5 lecturas semanales durante 3 semanas.

Toda la información obtenida de la lectura de los medios se recolectó en formatos especialmente diseñados.

3. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas de las variables categóricas se analizaron mediante la prueba de Chi

cuadrado; los análisis se realizaron con el paquete EPISTAT en un computador IBM AT.

RESULTADOS

Las muestras analizadas fueron predominantemente de individuos mayores de 14 años remitidos por instituciones oficiales o por médicos en ejercicio de la práctica privada.

1. Dermatofitos

Se aislaron 65 cepas de dermatofitos en las 150 muestras recolectadas (43%). El número de colonias por caja osciló entre un mínimo de 2 y un máximo de 11. El dermatofito con el mayor número promedio de colonias fue el *M. canis* y el de menor, el *T. mentagrophytes*. No hubo diferencias significativas atribuibles a los varios medios.

Con relación a las características morfológicas y de pigmentación de los agentes aislados no se observaron colonias atípicas en ninguno de los tres medios comparados.

Se aislaron 5 especies de dermatofitos que en orden de frecuencia fueron: *E. floccosum* (27 aislamientos), *T. rubrum* (23 aislamientos), *T. mentagrophytes* (9 aislamientos), *M. canis* (4 aislamientos) y *M. gypseum* (2 aislamientos).

La Tabla N° 1 muestra que el Mycobiotic Agar fue el medio más adecuado para aislar el *E. floccosum* y el *T. mentagrophytes*; el Kaminski y su versión modificada lo fueron para el *T. rubrum*; los tres medios se comportaron igual frente al *M. canis* y al *M. gypseum*; las diferencias no fueron significativas.

El tiempo de crecimiento fluctuó entre 3 y 14 días; las diferencias en la velocidad de crecimiento tampoco fueron significativas.

En la Tabla N° 2 se aprecia que el medio de Kaminski modificado fue el más contaminado ($p < 0.05$) y las diferencias fueron altamente significativas en lo referente a la contaminación micótica ($p < 0.00005$).

No hubo diferencias en la rapidez con que se desarrollaron los contaminantes y la tasa de contaminación varió entre 33 y 57%. La contaminación, sin embargo, no dificultó la lectura de los cultivos.

2. *S. schenckii* y agentes de cromomicosis

Se obtuvo crecimiento de la totalidad de cepas de *S. schenckii* y de agentes de cromomicosis en los

TABLA Nº 1

FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE DERMATOFITOS SEGUN EL MEDIO UTILIZADO

| Medio utilizado | Especie de dermatofito (%) | | | | |
|-----------------|----------------------------|------------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------|
| | <i>E. floccosum</i> (27)* | <i>T. rubrum</i> (23)* | <i>T. mentagrophytes</i> (9)* | <i>M. canis</i> (4)* | <i>M. gypseum</i> (2)* |
| 1 | 100 | 89 | 100 | 100 | |
| 2 | 93 | 100 | 91 | 100 | |
| 3 | 85 | 100 | 96 | 100 | |

Número de aislamientos.

tres medios de cultivo ensayados. No hubo diferencias en la frecuencia de crecimiento, en las características morfológicas de las colonias ni en la velocidad de crecimiento; ésta varió entre 2 y 7 días.

Todos los hongos dematiáceos esporularon en el medio de Kaminski modificado y no fueron necesarios los microcultivos. En el medio Mycobiotic la esporulación fue ocasional. La gran mayoría de colonias de *S. schenckii* cultivadas en agar Mycobiotic fueron albinas o poco pigmentadas, mientras en

el medio de Kaminski modificado la pigmentación fue intensa.

Es importante mencionar que el medio de Kaminski modificado permitió el crecimiento de levaduras del género *Candida* en una proporción doble de la obtenida en agar Mycobiotic. La especie predominante fue *C. albicans* pero se aislaron también otras especies diferentes.

DISCUSION

Cabe destacar que la única característica en la cual se demostraron diferencias significativas entre los tres medios fue la tasa de contaminación microbiana en los cultivos de dermatofitos. En el medio de Kaminski modificado creció el mayor número de contaminantes; sin embargo, ello no dificultó la lectura.

El índice de contaminación fue ligeramente inferior al obtenido previamente por Santamaría y col (4) en nuestro laboratorio (33 a 57% vs 58 a 78%).

Este estudio pone de manifiesto la utilidad del medio de Kaminski adicionado de nistatina, dados su bajo costo y la fácil disponibilidad de sus ingredientes. Este agar enriquecerá el armamentarium de medios selectivos para el aislamiento de hongos patógenos; es eficiente para el aislamiento de dermatofitos, *S. schenckii* y agentes de cromomicosis e, igualmente, para el de levaduras del género *Candida*; también facilita la identificación de los hongos dematiáceos sin recurrir a los microcultivos y permite definir con mayor precisión las características de pig-

TABLA Nº 2

FRECUENCIA DE CONTAMINACION EN TRES MEDIOS SELECTIVOS INOCULADOS CON MUESTRAS SOSPECHOSAS DE INFECCION DERMATOFITICA

| Tipo de Contaminación | Medio % de contaminación | | |
|-----------------------|--------------------------|----|----|
| | 1 | 2 | 3 |
| Bacteriana sola | 13 | 7 | 10 |
| Micótica sola | 13 | 17 | 30 |
| Mixta | 10 | 12 | 17 |
| Total | 33 | 36 | 57 |

mentación de las cepas de *S. schenckii*, lo cual resulta ventajoso y permite ampliar las posibilidades diagnósticas utilizando un medio de cultivo único.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue auspiciada por el Centro de Investigaciones Médicas de la Universidad de Antioquia y por el Instituto Colombiano para el Fomento de la Educación Superior (ICFES).

SUMMARY

MODIFIED KAMINSKI AGAR FOR THE ISOLATION OF DERMATOPHYTES AND SOME OTHER PATHOGENIC FUNGI

Three culture media with different composition (Mycobiotic agar, Kaminski agar and Kaminski agar modified with nystatin) were evaluated for isolation of dermatophytes and reisolation of *S. schenckii* and dematiaceous fungi. One hundred and fifty specimens of cases suspicious of dermatophytosis, as well as 30 strains of *S. schenckii* and 10 of chromoblastomycosis agents were studied. The modified Kaminski agar was efficient for the isolation and reisolation of the tested agents, in spite of its greater contamina-

tion rate; it was equally adequate for isolation of *Candida* species.

BIBLIOGRAFIA

1. SABOURAUD R. Le trichophyties humaines. Paris: Masson, 1884.
2. GEORG LK. Use of cicloheximide medium for isolation of dermatophytes from clinical lesions. *Arch Dermatol Syphil* 1953; 63: 355-361.
3. MCDONOUGH ES. Growth of dimorphic human pathogenic fungi on media containing cycloheximide and chloramphenicol. *Mycopath Mycol Appl* 1960; 13: 113-120.
4. SANTAMARIA L, ESCOBAR ML, MONCADA LH, et al. Evaluación de cuatro medios selectivos para aislamiento de hongos patógenos. *Acta Méd Col* 1986; 11: 225-229.
5. BORELLI D. Medios caseros para micología. *Arch Venez Med Trop Parasit Med* 1962; 4: 301-310.
6. KAMINSKI GW. The routine use of modified Borelli's Lactrimel agar (MBLA). *Mycopathologia* 1985; 91: 57-59.
7. RIPPON JW. Medical Mycology. The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes. 3a ed. Philadelphia: Saunders, 1988: 798.
8. REBELL G, TAPLIN D. Dermatophytes: Their recognition and identification. 2a ed. Coral Gables: Miami University Press, 1970: 124.
9. LANGERON M, MILOCHEVITCH S. Morphologie des dermatophytes. *Ann Parasitol Hum Comp* 1930; 8: 465-508.