

COMUNICACIONES BREVES

ESTUDIO COMPARATIVO DEL AGAR ISO-SENSITEST Y EL AGAR MUELLER-HINTON

Margaret Ordoñez Smith de Danies¹

Se estudiaron 710 cepas bacterianas provenientes de diferentes muestras para comparar las zonas de inhibición de los diámetros obtenidos en agar Iso-Sensitest y el agar Mueller Hinton. Se realizaron bajo la técnica de difusión en disco de la NCCLS (Comité Nacional para los Estándares de Laboratorio Clínico). Estadísticamente, al analizar el chi-cuadrado de las muestras estudiadas, se observó una confiabilidad del 99%, por lo tanto no hay diferencia entre los dos medios de cultivo. En el agar Iso-Sensitest se obtuvo una mejor nitidez con los diámetros de los halos de inhibición, se encontró un 62,0% de mejor lectura o mayor visibilidad en los diámetros de las zonas de inhibición con los cultivos de *Enterococcus sp.*, un 21,4% con el *Staphylococcus aureus* y 20,0% en el caso de la *Providencia stuartii*.

Palabras claves: medios para antibiogramas, agar Iso-Sensitest, agar Mueller Hinton, técnica de difusión en disco.

INTRODUCCION

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio comparativo de dos medios de cultivo, el agar Iso-Sensitest y el agar Mueller Hinton. Las lecturas de los halos de inhibición en los antibiogramas realizados se realizó con la técnica de difusión en disco. Desde 1941 (1) se describió el agar Mueller Hinton y se ha establecido que es el mejor medio para realizar dichas pruebas; sin embargo hay diferencia entre los lotes de producción del medio lo que ocasiona resultados algunas veces no comparables ni reproducibles (2,3). Actualmente hay varios medios de cultivo que pueden emplearse para hacer la técnica de difusión en disco, entre ellos están el agar Diagnostic Sensitivity Test, agar Sensitest y el agar Iso-Sensitest (4,5,6). El agar iso-Sensitest tiene una preparación semi-sintética, en el cual todos sus ingredientes van en proporciones siempre exactas.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas. Se analizaron 710 cepas bacterianas provenientes de diversas muestras:

370 orinas, 140 secreciones vaginales, 67 gargantas, 59 heces, 23 secreciones uretrales, 20 fosas nasales, 12 acnés, 7 oídos, 4 esputos, 5 ojos, 2 de heridas y 1 de seno. Se aislaron 454 Gram negativas, y 256 Gram positivas. (Tabla 1).

Control de calidad. Los sensidiscos y los medios de cultivo se controlaron bajo las normas de la Sociedad Americana de Microbiología (7,8) y de Koneman (9). Los sensidiscos analizados en nuestro estudio fueron: ácido nalidíxico (30 mcg), ampicilina (10 mcg), aztreonam (30 mcg), cefradina (30 mcg), clindamicina (10 mcg), nitrofurantoína (300 mcg), norfloxacin (10 mcg), oxacilina (1 mcg), sisomicina (10 mcg) trimetropín/sulfametoxazol (1,25/23,75 mcg)

Medios de cultivo. Se utilizaron agar Mueller Hinton y agar Iso-Sensitest, éste último es preparado semi-sintéticamente y contiene bajas cantidades de calcio y magnesio como se puede observar en la Tabla 2 (3,5,10,11,12).

Antibiogramas o pruebas de sensibilidad. Se realizaron bajo el método de Kirby Bauer, descri-

¹ Directora científica del Instituto de Microbiología Colombiana. Apartado 93.151, Bogotá, Colombia.

to como el método de difusión en disco aprobado por la NCCLS (Comité de Control de Estándares de los Laboratorios Clínicos) de Estados Unidos (2). Primero se aísla la bacteria y una vez que se tenga la bacteria pura, se incuba a 37° C en caldo triptona soya para obtener un inóculo 10⁸ bacterias por mililitro, lo que corresponde al estándar de turbidez de la Escala de McFarland No. 0,5. Esta se prepara: 0,5 ml de BaC12 al 0,048 M (BaC12,2H2O 1,175%) a 99,5 ml de una solución de H2SO4 de 0,36n o 1%. Cuando el caldo triptona soya da la turbidez precisa, se siembra masivamente la bacteria en el medio de cultivo. En nuestro estudio se tomaron escobillones diferentes del mismo caldo para sembrar en forma masiva en los dos medios para antibiogramas (agar Mueller-Hinton y agar Iso-Sensitest).

Tabla 1. Bacterias aisladas en el estudio

Bacteria	Total	Mejor nitidez en	
		ISO	MH
		No (%)	
GRAM POSITIVAS	256		
Enterococcus sp	29	18(62,0)	—
Staphylococcus aureus	221	39(21,4)	—
Staphylococcus saprophyticus	6	—	—
GRAM NEGATIVAS	454		
Arizona sp	1	—	—
Enterobacter cloacae	3	—	—
Escherichia coli	280	2 (0,7)	2 (0,7)
Klebsiella pneumoniae	14	—	—
Klebsiella oxytoca	11	—	—
Klebsiella ozaenae	11	—	—
Morganella morganii	4	—	—
Proteus mirabilis	48	—	—
Proteus vulgaris	2	—	—
Providencia stuartii	10	2 (20,0)	—
Pseudomonas aeruginosa	8	—	—
Salmonella sp	9	—	—
Serratia	3	—	—
Shigella	23	—	—
Yersinia	27	—	—

Tabla 2. Fórmula de los medios para la prueba de difusión en disco (gramos por litro)

Agar Mueller-HintoN		Agar Iso-Sensitest	
Infusión de carne	300,0	Caseína hidrolizada	11,0
Caseína hidrolizada	17,5	Peptonas	3,0
Almidón	1,5	Almidón soluble	1,0
Agar No 1	10,0	NaCl	3,0
		Dextrosa	2,0
		Fosfato disódico	2,0
		Acetato de sodio	1,0
		Glicero fosfato de magnesio	0,2
		Calcio gluconato	0,1
		CoSo4	0,001
		CuSo4	0,001
		ZnSo4	0,001
		FoSo4	0,001
		MnCl ₂	0,002
		Menadiona	0,001
		Cianocobalamina	0,001
		L Cisteína hidrocloreuro	0,02
		L Tryptófano	0,02
		Piridoxina	0,003
		Pantotenato	0,003
		Nicotinamida	0,003
		Biotina	0,0003
		Tiamina	0,00004
		Adenina	0,01
		Guanina	0,01
		Xantina	0,01
		Uracito	0,01
		Agar No.1	8,0

Interpretación de las zonas de inhibición. Se reportaron tomando una reglilla y leyendo en milímetros las zonas de inhibición. Luego se comparaban con un programa de computador desarrollado para este fin, para saber cuántos milímetros había de diferencia entre ellos. Con los datos obtenidos de las diferencias de las zonas de inhibición, se aplicó el método de chi-cuadrado para saber si existía alguna diferencia entre los dos medios de cultivo estudiados.

RESULTADOS

Se midieron los diámetros de los dos medios y las diferencias (mayores o menores) observadas en la Tabla 3. Fue cuando se comparó el

agar Iso-Sensitest con respecto al agar Mueller Hinton. Con el agar Iso-Sensitest se presentaron diámetros mayores con los antibióticos aztreonam con + 1,70 mm y el ácido nalidíxico +1,58 mm para bacterias Gram negativas.

Estadísticamente al analizar el chi-cuadrado dio una confiabilidad del 99%, porque los diámetros de las zonas de inhibición con el agar Mueller Hinton o agar Iso-Sensitest no presentaron una diferencia significativa ($P < 0,5$) (13). Esto es que, se admite la desviación obtenida que no es significativa y por lo tanto, los datos se ajustan aceptablemente a la hipótesis, o sea que el agar Iso-Sensitest no produce zonas de inhibición diferentes a las del agar Muller Hinton.

En la Tabla 1 se observan las diferentes bacterias con las cuales se realizó el estudio. En general las zonas de inhibición son más nítidas para leer en el agar Iso-Sensitest y se observó mayor nitidez en el agar Iso-Sensitest para el *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus sp.*, Pero hay una franca mejoría con respecto a la visibilidad en las lecturas de las zonas de inhibición con el *Enterococcus sp.*, y un 21,4% de casos de *Staphylococcus aureus*. Solamente con las bacterias Gram negativas, hubo diferencia en el caso de la *Providencia stuartii*, que dio 20,0% de mayor claridad en las lecturas con el agar Iso-Sensitest. En el caso de la *E. coli* hubo igual porcentaje.

DISCUSION

La NCCLS recomienda el agar Mueller Hinton, pero este medio de cultivo tiene muchos inconvenientes, por lo cual en los años setentas se comenzaron a describir otros medios de cultivos con más ventajas. El agar Mueller Hinton y aún el caldo de Mueller Hinton (14), no son medios semi-sintéticos, por ello hay una gran variabilidad entre lote y lote en su fabricación (3,5,10,11,12). Además las concentraciones de los cationes son variables; en cambio el agar Iso-Sensitest tiene su composición fija. (Tabla 2). Reller (10) recomienda que haya de 20-50 mg de magnesio y de 50-100 mg de calcio por litro, encontrando una influencia del magnesio y calcio en *Pseudomonas aeruginosa* para los aminoglicósidos; Zimelis (11) ha encontrado interacción del magnesio o calcio con *Pseudomonas aeruginosa*, dando resistencia a los aminoglicósidos.

Por lo dicho anteriormente se recomienda para los antibiogramas de difusión en disco el uso del agar Iso-Sensitest, por su exactitud y porque no hay variabilidad entre lotes de fabricación. Se obtiene en especial una mayor nitidez con todas las bacterias, sobretodo para las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus sp.*) Es muy útil clínicamente, ya que actualmente hay una mayor incidencia en la necesidad de hacer el antibiograma a los *Enterococcus* por su resistencia bacteriana (15,16).

Tabla 3. Con 710 muestras diferentes se compararon los diámetros de las zonas de inhibición con el agar Iso-Sensitest y el agar Mueller-Hinton de acuerdo a la técnica de NCCLS difusión en difusión en disco.

AGENTE ANTIMICROBIANO	BACTERIAS GRAM POSITIVAS		BACTERIAS GRAM NEGATIVAS		CASOS Total (No)
	Casos (No)	Diámetro (mm)	Casos (No)	Diámetro (mm)	
Acido Nalidíxico	14	+1,43	334	+1,58	448
Ampicilina	256	+0,38	454	+1,02	710
Aztreonam	NH	NH	444	+1,70	444
Cefradina	256	+1,03	454	-0,02	710
Clindamicina	250	+0,52	NH	NH	250
Nitrofurantoina	83	+0,07	386	+0,73	469
Norfloxacina	163	+0,29	320	-0,44	483
Oxacilina	175	+0,43	NH	NH	175
Sicomocina	256	-0,47	454	-1,03	710
Trimetoprim/Sulfametoxazol	256	+0,06	454	+1,32	710

BACT: Bacteria. NH: No se hizo.

Con respecto a los sensibilizadores analizados, es bien sabido que el aztreonam no tiene afinidad para Gram positivos, por lo cual no se realizó. Igualmente la oxacilina no actúa para Gram negativos.

SUMMARY

710 strains of bacteria from different specimens were studied in order to compare the zone sizes of inhibition from the Iso-Sensitest agar and Mueller-Hinton agar. The disk diffusion technique of the NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) was used. Statistically, using chi-square analysis for the specimens under observation, a reliability of 99% was obtained, therefore, there is no significant difference between the two media. In Iso-Sensitest agar, greater clarity was obtained for the diameters of inhibition halos; 62.0% better readings or greater visibility of inhibition zones was observed with cultures such as *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus* showed up more sharply in 21.4% and *Providencia stuartii* in 20.0% flasks.

Keywords: antibiogram medium, Iso-Sensitest agar, Mueller Hinton, disk diffusion technique.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre, el Dr. J. Hernando Ordóñez, por sus comentarios sobre el tema. A los laboratorios Bristol Myers Squibb S. A. por el suministro de algunos de los sensibilizadores en el estudio. Y a mi esposo, Gustavo Danies Silva, por el desarrollo del sistema en el computador para comparar los diámetros de las zonas de inhibición.

REFERENCIAS

1. **Mueller J H, Hinton J.** A protein-free medium for primary isolation of gonococcus and meningococcus. Proc Soc Exp Biol and Med 1941; 48: 330.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 4th. ed. Approved Standard NCCLS Document M2-A4. Villanova, Pa: NCCLS, 1990.
3. **Yourassowsky E, Vandertlinden MP, Schoutens E.** Sensitivity of *Streptococcus pyogenes* to sulphamethoxazole, trimethopim and cotrimoxazole. J Clin Pathol. 1974; 27: 897
4. **Snell J J S, Brown D F J, Gardner P S.** Comparison of results from two antibiotic susceptibility testing trials that formed part of the United Kingdom national external quality assessment scheme. J Clin Pathol. 1984; 37:321.
5. **Garrod L P, Water Worth P M.** A study of antibiotic sensitivity testing with proposals for simple uniform methods. J Clin Path. 1971; 24: 779.
6. **Cheesbrough M.** Medical Laboratory Manual for Tropical Countries. 5th ed. England: Thetford Press Ltd., 1984;198.
7. **August M J, Hindler J A, Huber T W, Sewell AD I.** Cumitech 3A. Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology. Coordinating ed. A S Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1990; 1
8. **Sahm, D F, Neuman, M A, Thonsberry C, McGowan Jr. J E.** Cumitech 25. Current concepts and approaches to antimicrobial agent susceptibility testing. Coordinating ed. McGowan Jr J E. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1988;1
9. **Koneman E W, Allen S D, Dowell Jr. V R, Sommers H M.** Diagnostic Microbiology, J B Lippincott Company, Philadelphia. 1979; 185:327
10. **Reller L b, Schoenknecht FD, M A, Sherris J C** Antibiotic susceptibility test of *Pseudomonas aeruginosa* Selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. J Infect Dis 1974;130: 454
11. **Zimelis V M, Jackson G G.** Activity of aminoglycosides antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* : specificity and site of calcium and magnesium antagonism. j Infect Dis. 1973; 127(6): 663
12. **Daviss SD, Iannetta A, Wedwood R. J.** Activity of colistin against *Pseudomonas aeruginosa* Inhibition by calcium. J Infect Dis. 1971;124(6): 610
13. **Parker, RE.** Estadística para biólogos. Ediciones Omega Barcelona. 1976; 48
14. **Joyce LF, Stockman K, Downes J, Andrew J. H.** Comparison of the Sceptor *Pseudomonas* plus Mic panel with agar dilution for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 1992;30(10):2714
15. **Louie M, Simor A E, Szeto S, Patel M, Kreiswirth B, Low D E.** Susceptibility testing of clinical isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol. 1992;30: 41
16. **Hall L M C, Duke B, Urwin G, Guiney M.** Epidemiology of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection in a teaching hospital in London, United Kingdom. J Clin Microbiol. 1992;30: 1953