

UTILIZACION DE AGAR MUELLER HINTON EN MICOLOGIA PARTE I

Lucía Salamanca F. y María Cristina Díaz J.
Unidad de Microbiología Div. Ciencias Med. Oriente
Fac. de Medicina. Universidad de Chile - Santiago

RESUMEN

Con el fin de probar la utilidad del Agar Mueller Hinton en micología médica, para futuros ensayos con drogas antifúngicas, se compara el desarrollo de Dermatofitos (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *E. floccosum*) y especies de *Candida* en este medio y en ASG 20% - 40%, YMA y DST. Se comprueba que el Agar Mueller Hinton es tan eficaz como el ASG para el crecimiento de estos hongos en los plazos recomendados para estudios de sensibilidad.

Los estudios de sensibilidad antifúngica son bastante complejos y ha sido difícil estandarizar técnicas relativamente sencillas reproducibles en nuestros laboratorios debido a las características de crecimiento de los hongos y a la labilidad de algunos antifúngicos cuyas propiedades bioquímicas influyen en la elección del medio de cultivo, la cantidad de inóculo, el tiempo y la temperatura de incubación.

Con respecto al medio utilizado en técnicas de sensibilidad, debe cumplir con los requisitos de no inhibir el desarrollo de los hongos ni alterar la actividad de los antimicrobianos ya sea por su constitución o por productos de metabolismo fúngico, en dicho medio.

Se ha recomendado diversos medios de cultivo según la droga en estudio, tales como Sabouraud glucosado (1), Yeast Morphology Agar, Yeast Nitrogen Base, Antibiotic Medium Nº 12 y Nº 3 de Difco, Casein Yeast-Extract Glucose Agar, Kimmig's Agar de Merck (2), SAAM, F (Synthetic Aminoacid Medium, fungal (3), Sabhi (4) y otros adicionados o no de buffer. La mayoría de ellos son difíciles de conseguir o esterilizar en nuestro medio.

El Agar Sabouraud Glucosado, muy utilizado con todas las drogas por varios autores (5, 6, 7, 8) por su fácil disponibilidad, no es apropiado para imidazólicos, ni 5 Fluorocitosina (9, 10). Sólo se ha probado que es el más indicado en estudios con Anfotericina B.

Hemos deseado probar un medio comúnmente usado en nuestros laboratorios, en estudios de sensibilidad bacteriana, por su nula o escasa interferencia

SUMMARY

[*The evaluation of Mueller Hinton Agar in Mycology. Part. I*]

The usefulness of Mueller Hinton Agar was tested in medical mycology, with the purpose of employing this media in future assays with antifungal drugs. The growth of dermatophyte (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* and *E. floccosum*) and *Candida* species in this media was compared with S.G.A. at 20% - 40%, Y.M.A. and D.S.T.

It was concluded that Mueller Hinton Agar is so efficient as S.G.A. for the development of these fungi in the recommended time for sensibility studies.

en la actividad de las drogas: el Agar Mueller Hinton (MH), Difco esterizable en autoclave.

El objetivo de este estudio inicial fue observar si el medio Mueller Hinton permite un buen desarrollo de hongos filamentosos, semejante al que se presenta en medios de cultivo habituales o empleados en estudio de sensibilidad.

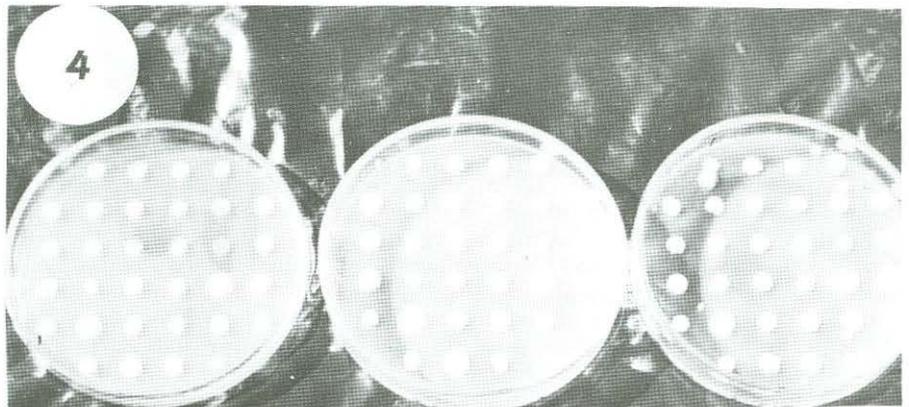
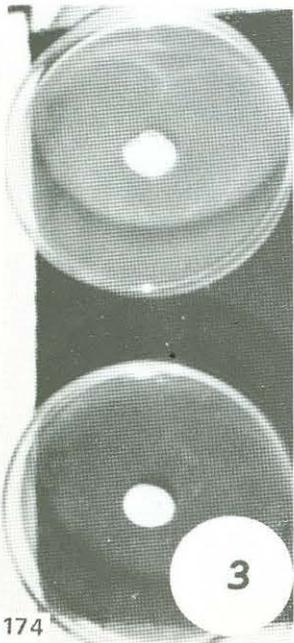
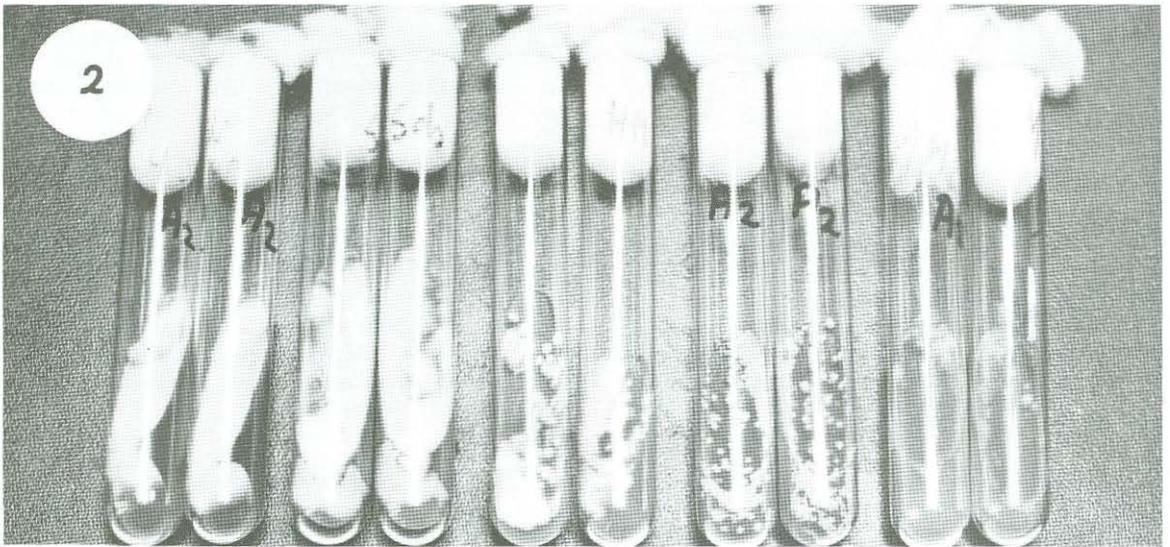
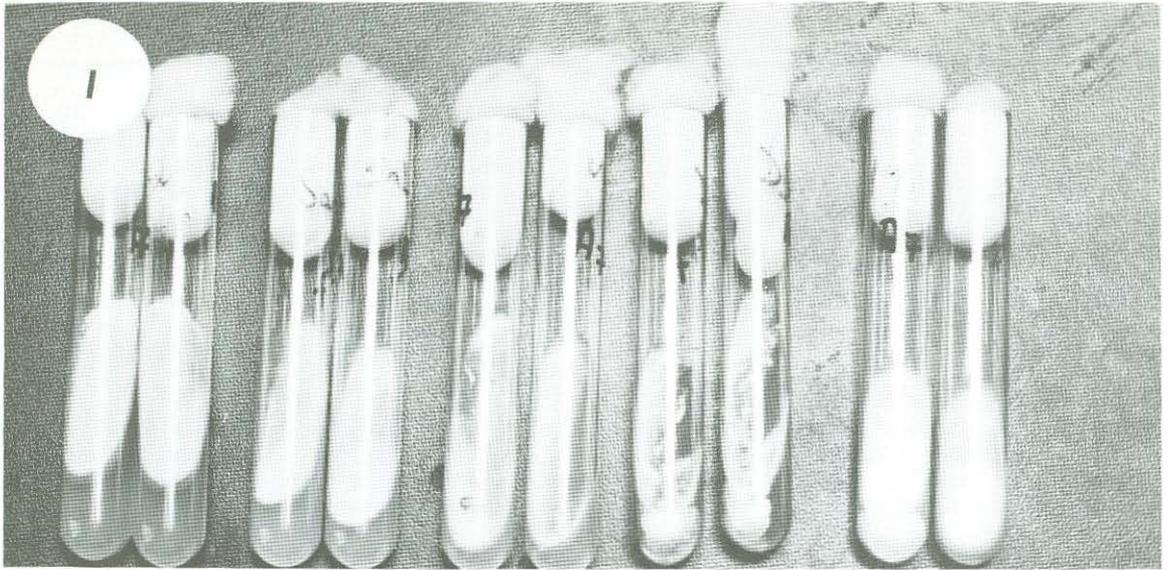
MATERIAL Y METODOS

1er. Estudio

Se observó el crecimiento de cepas de dermatofitos y levaduras en Agar Mueller Hinton y se comparó con el observado en Agar Sabouraud con 20 y 40% de glucosa (ASG), Yeast Morphology Agar (YMA) y DST (Oxoid).

Los 5 medios de cultivo se prepararon y controlaron 24 horas antes para evitar diferentes grados de desecación y se repartieron equitativamente en tubos inclinados del mismo tamaño para hongos filamentosos y en placas para levaduras.

Se incubaron en ASG 2 cepas de *Candida albicans* y 7 de dermatofitos (2 *M. canis*, 2 *T. rubrum*, 1 *M. gypseum*, 1 *T. mentagrophytes* y 1 *E. floccosum*) por 12 días a 25° C. Luego se prepararon suspensiones de conidios o levaduras en agua destilada estéril. Se agitaron con Vórtex y se ajustaron a una concentración equivalente a la del tubo 1/2 de la escala de Mc Farland (patrón usado en los estudios de sensibilidad, que da 95 a 97% de transmitancia a 530 nm de longitud de onda). Se inoculó 0,2 cc de cada cepa en 2 tubos de cada tipo de Agar y se incubaron



Fotos 1 y 2: *M. canis* (1) y *E. floccosum* (2) a los 13 días de incubación a 25° C, ASG 40%, ASG 20%, MH, DST e YMA.

Foto 3: Tamaño de la colonia de *T. mentagrophytes* a los 6 días de incubación en MH (extremo superior) y ASG a 25° C.

Foto 4: Crecimiento de levaduras a las 48 horas a 37° C en ASG, YMA y MH.

éstas por 8 a 13 días, a 25° C. (Fotos 1 y 2).

El desarrollo de las cepas fue evaluado por separado por 3 expertos, en cada medio de cultivo (2 tubos por cepa) usando una escala entre 0 y 4 puntos: 0 sin desarrollo; 4 crecimiento abundante que cubre toda la superficie (colonias confluentes), de modo que el puntaje máximo por cepa era de 12 (3 evaluadores por 4 puntos).

2do. Estudio

Para comparar la velocidad de crecimiento de las cepas de dermatofitos, se preparó una suspensión de conidios equivalente al tubo N° 1 de la escala de Mc Farland y se depositó 0,05 ml en el centro de una placa de petri con MH y de otra con ASG 20%. Una vez secas las gotas se invirtieron las placas y se incubaron a 25° C. Se midieron los diámetros (en mm.) de las colonias, a los 6 y 13 días de incubación (Foto 3).

El análisis de los resultados se realizó mediante el uso de 2 test de hipótesis: el test de aleatorización y el Mann-Whitney, para muestras independientes.

3er. Estudio

Finalmente se observó el desarrollo de 32 cepas de levaduras —en su mayoría *C. albicans*— aplicadas con el múltiple aplicador de Steers a partir de una emulsión de 10⁶ levaduras por ml., en Sabouraud, YMA y MH, las que fueron incubadas en placas a 37° C. durante 48 horas.

RESULTADOS

1er. Estudio

Los puntajes otorgados por los 3 expertos, muestran que el mayor desarrollo se obtuvo en SG

al 20% y el menor en YMA, obteniéndose en MH un desarrollo intermedio. Sólo en levaduras el desarrollo en MH es el menor de todos (Cuadro 1).

CUADRO 1

Evaluación del desarrollo de 7 cepas de hongos y levaduras según medio de cultivo.

CEPA	ASG 20%	ASG 40%	MH	YMA	DST
<i>T. mentagrophytes</i>	12	12	10.5	6	6
<i>E. floccosum</i>	12	12	9	4	8
<i>M. gypseum</i>	12	10	12	6.5	11
<i>M. canis</i>	9	9	9	3	9
<i>M. canis</i>	12	12	12	7	10
LEVADURAS					
<i>C. albicans</i>	12	12	10	12	12
<i>C. albicans</i>	12	12	9	11	10
Total Dermatofitos	57 (95%)	55 (91.7%)	52 (87.59%)	26.5 (44.2%)	44 (73.3%)
Total <i>C. albicans</i>	24	24	19	23	22
Total	81 (96.4%)	79 (94%)	71.5 (85.1%)	49.5 (58.9%)	66 (78.6%)

NOTA: Las 2 cepas de *T. rubrum* no fueron consideradas por haberse desarrollado mal en SG al 20 y 40% y no crecer en DST ni YMA.

CUADRO N° 2

Diámetros de las colonias de las 9 cepas en ASG y MH, a los 6 y 13 días de incubación.

CEPAS	6 días		13 días	
	ASG	MH	ASG	MH
<i>T. mentagrophytes</i>	18x17	19x17	37x37	31x31
<i>T. mentagrophytes</i>	13x11	15x12	28x26	30x27
<i>T. mentagrophytes</i>	18x12	11x 8	42x42	24x20
<i>T. mentagrophytes</i>	17x17	19x19	45x40	31x30
<i>M. Canis</i>	25x25	27x27	60x60	35x35
<i>E. floccosum</i>	10x10	11x10	26x26	22x20
<i>T. rubrum</i>	5x5	13x13	11x11	21x19
<i>T. rubrum</i>	8x8	12x10	17x17	22x22
Area promedio (mm ²):	221	260	1293.4	716.1
Desv. standard (s):	192.30	213.97	1126.84	307.04
Veloc. crecimiento (mm ² x día):			153.2	65.2

2do. Estudio

El área promedio de las colonias fue mayor en MH a los 6 días e inferior a los 13 días de incubación, lo que muestra que la velocidad de crecimiento fue superior en ASG (2.3 veces mayor que en MH) (Cuadro N° 2).

3er. Estudio

El desarrollo de las 32 cepas de levaduras fue bueno y semejante en los tres medios de cultivo a las 48 hrs. de incubación (Foto 4).

COMENTARIOS

De los resultados observados se desprende que el medio MH reúne los requisitos necesarios para un buen desarrollo de hongos, pues si bien el desarrollo en este medio se observa inferior —aunque no significativamente— al observado en ASG al 20 ó 40%, en especial para hongos filamentosos, los dermatofitos se desarrollan levemente mejor que en DST (usado por algunos autores en estudios de sensibilidad antifúngica); y significativamente mejor que en YMA, recomendado para estudios con drogas antimicóticas ($p=0.004$). Las levaduras crecen mejor en YMA o DST, sin embargo su multiplicación en MH es aceptable, con 3 puntos o más por investigador sobre un máximo de 4 puntos. (Cuadro 1).

Por otra parte, se puede apreciar que a los 6 días de incubación las colonias de MH tienen un diámetro superior que el ASG, aunque no estadísticamente significativo (ver promedios en cuadro 2). Al pasar más tiempo, los hongos muestran un aumento estadísticamente significativo en el desarro-

llo en ambos medios, especialmente en ASG, en donde a los 13 días, el diámetro de las colonias llega a superar al de las incubadas en MH, aunque de manera no significativa. Sin embargo, este retardo en el desarrollo en MH no es de importancia ya que la lectura de los estudios de sensibilidad debe realizarse en los primeros 2 a 6 días y no después.

Pudimos observar también una esporulación más precoz en MH y una mayor tendencia al pleomorfismo con ASG en las colonias con 13 días de incubación, probablemente por ser éste un medio más rico.

El buen desarrollo de los hongos en MH nos hace pensar que puede tratarse de un buen medio de cultivo para ensayar con drogas antifúngicas. Su pH es neutro a diferencia de YMA e YNB cuyo pH ácido disminuye la actividad de los polienos.

Su riqueza en fosfatos que neutralizan iones como calcio⁺ y magnesio⁺ que a su vez interfieren en la actividad de las drogas, le ha permitido ser uno de los medios más apto en estudio con antimicrobianos. Por último, es un medio comercial bien estandarizado, de fácil disponibilidad y manejo al ser autoclavable.

CONCLUSIONES

Al Agar Mueller Hinton es un medio que permite un desarrollo de hongos filamentosos y levaduras tan eficiente como los medios Agar Sabouraud con 20 y 40% de glucosa y DST (Oxoid) y más eficiente que con Yeast Morphology Agar.

El tamaño de las colonias con MH es similar al observado en Agar Sabouraud glucosado en estudios de crecimiento realizados a los 6 y a los 13 días de incubación, siendo mayor la velocidad de crecimiento en ASG entre 6 y 13 días.

REFERENCIAS

- 1.- Lorian V. (1950). Antibiotics in laboratory medicine. The Williams and Wilkins Co. Baltimore Md. USA.
- 2.- Lennette E. H., Spaulding F.H., Tenet J. P. (1980). Manual of Clinical Microbiology. 3a. Ed. Sec. VII. Am. Soc. for Microbiology, Washington D.C.
- 3.- Hooprich, P.D. y Huse, A. C. (1955). Stability of four antifungal antibiotics in vitro. J. Infect. Dis. 137: 87-90.
- 4.- Huley, L. D. y Callaway, C. S. (1978). Laboratory methods in medical mycology. 4a. Ed. U.S. Dept. of H. E. W. Center for Disease Control, Atlanta Ga. USA.
- 5.- Negróni, P. y Rodríguez, Z. J. (1973) Ensayos sobre la acción fungistática y fungicida del miconazol. Bol. A.N. de Med. 51: 123-130.
- 6.- Zaror, L., Guth, L. y Tejero, A. (1981). Susceptibilidad in vitro de dermatofitos, Candida y otros hongos frente a Clotrimazol. Bol. I. S. P. Chile 22: 64-68.

- 7.- Zaror, L., Otth, L. y Tejero, A. (1983). Concentraciones inhibitorias mínimas de miconazol para dermatofitos, *Candida* y otros hongos, Bol. I. S. P. Chile 24: 26-29.
- 8.- Zaror, L., Pinedo, M. y Otth, L. (1983). Actividad "in vitro" del ketoconazol sobre dermatofitos. Bol. I.S.P. Chile 24 : 30-31.
- 9.- Hoeprich, P.D. y Huston, A. C. (1976). Effect of culture media on the antifungal activity of miconazole and amphotericin B methyl-ester. I. Infect. Dis. 134 : 336-341.
- 10.- Utz, C.J. y Shadomy, S. (1977). Antifungal activity of 5-fluorocytosine as measured by disk diffusion susceptibility testing. J. Infest. Dis. 135: 970-974.