

***Enterococcus*, medios de cultivo convencionales y cromogénicos**

***Enterococcus*, conventional and chromogenic culture media**

MSc. Marilyn Díaz Pérez, Dr. C. Claudio Rodríguez Martínez, Dra. C. Raisa Zhurbenko

Centro Nacional de Biopreparados. La Habana, Cuba.

RESUMEN

El género *Enterococcus* ha sufrido variaciones en su clasificación y es considerado actualmente como un género independiente de *Streptococcus*. Por su elevada incidencia en las infecciones nosocomiales y su resistencia antimicrobiana, y por ser considerados indicadores de contaminación fecal, estos microorganismos han adquirido una importancia notable en la actualidad y se ha desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo de diferentes propósitos, tanto convencionales como cromogénicos y/o fluorogénicos, específicos para este género, que son empleados en los laboratorios de Microbiología de todo el mundo para lograr su aislamiento e identificación de muestras clínicas, aguas y algunos alimentos. La selección del tipo de medio a utilizar depende de la experiencia, así como también del tipo de muestra, del método de cultivo y del grado de contaminación de la muestra con otros organismos, por lo que resulta de gran importancia realizar una revisión bibliográfica sobre esta temática. El objetivo de esta revisión bibliográfica sobre el tema consiste en realizar una recopilación de los principales medios de cultivo existentes para este género, su principio de funcionamiento, así como los principales ingredientes que contienen, y resaltar las ventajas que tiene el uso de los medios cromogénicos y/o fluorogénicos al ser mucho más sensibles, rápidos y exactos.

Palabras clave: *Enterococcus*, *Streptococcus*, medios cromogénicos y fluorogénicos.

ABSTRACT

The genus *Enterococcus* has been classified in different manners. At present, it is considered to be a separate type of *Streptococcus*. These microorganisms have gained considerable importance due to their high incidence in nosocomial infections, their antimicrobial resistance and their role as indicators of fecal contamination. A

large number of culture media have been developed for different purposes related to this genus. These include conventional, as well as chromogenic and/or fluorogenic culture media, used in microbiology laboratories around the world for isolation and identification in clinical samples, water and some food products. Choice of a given medium is based on experience, sample type, culture method and degree of sample contamination with other organisms. Hence the importance of carrying out a bibliographic review of the subject. The purpose of this second bibliographic review was to collect information on the main culture media used for this genus, their operating principle and their main ingredients, highlighting the advantages of chromogenic and/or fluorogenic media, due to their greater speed, sensitivity and accuracy.

Key words: *Enterococcus*, *Streptococcus*, chromogenic and fluorogenic media.

INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de las especies de *Enterococcus* habitan normalmente en el tracto gastrointestinal, y se encuentran en una concentración de más de 10⁷ organismos por gramo de heces fecales.¹ Son miembros de la microbiota natural del tracto genital femenino¹ y no representan daños para el organismo en condiciones normales. Sin embargo, en ocasiones se comportan como patógenos oportunistas y pueden causar diferentes enfermedades, sobre todo en aquellos pacientes que han sido hospitalizados por períodos prolongados o sometidos a terapia antimicrobiana previa, que los convierte en un importante patógeno nosocomial.²

Estos microorganismos son considerados indicadores de la calidad sanitaria de las aguas y de algunos alimentos, por lo que su presencia en el ambiente indica contaminación de origen fecal.³ Por su elevada incidencia en las infecciones nosocomiales, su resistencia antimicrobiana, y por ser considerados indicadores de contaminación fecal, estos microorganismos han adquirido una importancia notable en la actualidad y se ha desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo de diferentes propósitos, tanto convencionales como cromogénicos y/o fluorogénicos, específicos para este género, que son empleados en los laboratorios de Microbiología de todo el mundo para lograr su aislamiento e identificación de muestras clínicas, aguas y algunos alimentos. La selección del tipo de medio a utilizar depende de la experiencia, así como también del tipo de muestra, el método de cultivo y del grado de contaminación de la muestra con otros organismos, por lo que resulta de gran importancia realizar una revisión bibliográfica sobre esta temática.⁴ El objetivo de esta segunda revisión bibliográfica sobre el tema consistió en realizar una recopilación de los principales medios de cultivo existentes para este género, su principio de funcionamiento, así como los principales ingredientes que contienen, y resaltar las ventajas que resulta el uso de los medios cromogénicos y/o fluorogénicos al ser mucho más sensibles, rápidos y exactos.

MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES PARA *ENTEROCOCCUS*

Se ha desarrollado una amplia variedad de medios de cultivo para el aislamiento de *Enterococcus* de aguas, alimentos, orina, heces u otros tipos de muestras.⁵⁻⁷ En estos medios se emplean varios agentes selectivos dentro de los que se encuentran la azida de sodio, el cloruro de sodio, el acetato de talio, el telurito de potasio, el tiocianato de potasio, el etil violeta, el cristal violeta, el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) y algunos antibióticos como, por ejemplo, kanamicina, gentamicina, ácido nalidixico, ácido oxolínico, polimixina o colistina.^{2,8} Estos agentes inhiben el crecimiento de hongos y bacterias Gram negativas y, a su vez, *Enterococcus* pueden metabolizarlos;⁹ sin embargo, no logran la inhibición total, pues en muchos de estos medios crecen otros microorganismos; además, la inclusión de la mayoría de estos agentes le confieren una elevada toxicidad, por lo que requieren de una cuidadosa manipulación y le restan estabilidad por ser, en su mayoría, sustancias altamente sensibles a la luz y a la temperatura.

La azida de sodio es el inhibidor activo contenido en la mayoría de estos medios. Muchas bacterias aerobias y anaerobias facultativas obtienen energía mediante el metabolismo respiratorio característico de las enzimas llamadas citocromos. La azida sódica actúa inhibiendo la transferencia de hidrógeno a través del sistema citocromo, bloquea el hierro de la molécula de citocromo en el estado férrico, e impide así la transferencia final del electrón al oxígeno molecular.⁵ Aquellos *Streptococcus* que carecen de la enzima citocromo, son capaces de desarrollarse en medios selectivos para *Enterococcus* que contienen azida sódica y forman ácidos por fermentación de la glucosa del medio, que provoca la aparición de un color amarillo visible.¹⁰ Además, se emplean otros ingredientes como inhibidores dentro de los que se encuentran el Tween 80, carbonatos, citratos y sales biliares.^{2,11}

Existen otros factores que contribuyen a la selectividad de los métodos de cultivo, como son las condiciones de crecimiento, en especial, el pH del medio, la temperatura de incubación, así como la concentración de cada uno de los inhibidores. Los relativamente bajos valores de pH (6,0 o 6,2), así como una temperatura de incubación elevada (42 o 45 C) son condiciones especiales de crecimiento para estos microorganismos. El uso correcto de los inhibidores, así como el incremento o disminución de las concentraciones de estos, también ofrece diferentes grados de selectividad al medio.¹¹

En estos diagnosticadores generalmente se añaden sustancias indicadoras que permiten el reconocimiento de los microorganismos y posibilitan la identificación de las especies por la apariencia de las colonias. En el caso de *Enterococcus* se aprovecha su capacidad para reducir el tetrazolio, y en casos especiales el telurito. También la formación de un complejo ferroso de esculina ha sido aplicado como criterio de identificación; sin embargo, para la correcta identificación o diferenciación de las especies deben ser considerados otros factores.¹¹

En un medio a pH 7,0 la mayoría de *Enterococcus* reduce el tetrazolio a fomazán, y provoca la aparición de colonias rojas brillantes que pueden ser fácilmente identificadas; sin embargo, a pH 6,2 o cercano a 6,0 esa reacción es evidente solo para la especie *E. faecalis*, mientras que *E. faecium* y otros *Enterococcus* muestran solo una reacción débil, con colonias claras con un centro rojo o colonias ligeramente rosadas.^{2,5,12}

Existe una diversidad de medios para el examen de *Enterococcus* en los que el crecimiento de estos microorganismos se ve favorecido por la presencia de peptonas, hidrolizados y extractos.⁶ La selección del tipo de medio a utilizar depende de la experiencia, así como también del tipo de muestra, el método de cultivo y del grado de contaminación de la muestra con otros organismos.⁵⁻¹³ Entre

los medios no selectivos para *Enterococcus* se pueden señalar el agar y el caldo cerebro corazón que son ampliamente utilizados para el cultivo y mantenimiento de *Enterococcus*, el caldo cerebro corazón con 6,5 % de cloruro de sodio, el agar triptona glucosa extracto, el agar y el caldo triptona soya, el agar MRS, el agar Rogosa, el agar M17, el caldo Elliker y el caldo Tood-Hewitt.^{2,6}

Medios como el agar sangre azida, el agar sangre azida con cristal violeta, el caldo azida de Rothery y el caldo citrato azida se emplean para la detección de *Enterococcus* en aguas y productos de desecho.⁹ Se han desarrollado otros medios como son el caldo BAGG, el caldo azida púrpura de bromocresol, el agar y caldo confirmatorio para *Enterococcus* y el caldo presuntivo para *Enterococcus* que se utilizan en las pruebas presuntivas y confirmativas de calidad para *Enterococcus*.^{2,9}

Los medios agar bilis esculina, medio leche azul de metileno, caldo salino modificado y caldo SF son empleados para la diferenciación de *Streptococcus* del grupo D de *Streptococcus* no pertenecientes a este grupo.² El medio agar bilis esculina es uno de los más utilizados. Se basa en la hidrólisis del glucósido de esculina contenido en la formulación.^{2,14} Ha sido empleado con la inclusión de vancomicina (6 mg/L) para el aislamiento de *Enterococcus* vancomicina resistentes de muestras de heces e hisopados rectales.^{2,15}

Este medio no es específico para el género *Enterococcus*, pues otros microorganismos como *Lactobacillus* y *Pediococcus* pueden crecer en él, incluso algunas especies como *Lactobacillus plantarum* no pueden distinguirse de *Enterococcus* porque exhiben la misma coloración ya que también hidrolizan la esculina.^{2,16}

El agar bilis esculina azida es otro medio desarrollado de acuerdo a la norma ISO 7899-2 para la enumeración y confirmación de los aislamientos que se obtienen a partir de las colonias que crecen sobre la membrana colocada sobre el medio agar selectivo para *Enterococcus* de aislamiento primario agar Slanetz-Bartley, a partir de muestras de agua.¹⁷ Este medio es conocido además con otras denominaciones: agar *Enterococcus* selectivo de Pfizer, agar Enterocococel, (Becton Dickinson) y D-Cococel (bioMérieux).² En este todos los *Enterococcus*, con excepción de *E. gallinarum*, muestran una fuerte reacción de hidrólisis de la esculina a las 24 h de incubación, y desarrollan colonias con un halo negro a su alrededor, pero igualmente pueden crecer cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, las cuales muestran colonias con estas mismas características, que pueden ser diferenciadas de *Enterococcus* por su tamaño.^{2,16} *Listeria monocytogenes* exhibe una morfología colonial similar a *Enterococcus* a las 48 h.²

El agar m-E (conocido también como m-agar azida), el agar Slanetz-Bartley, el m-medio azida y el agar selectivo para *Enterococcus* se emplean para la detección de *Enterococcus* por el método de filtración por membrana.^{2,9} Se conoce, por ejemplo, que con el medio agar m-E se obtienen recuentos superiores que por el procedimiento del número más probable.¹⁸ Además, se ha reportado que este medio es superior en el aislamiento, selectividad y enumeración de *Enterococcus* encontrados en aguas altamente contaminadas.¹⁹ Con la adición de carbonato de sodio (0,2 %) y Tween 80 (0,05 %) al agar m-E, se obtienen mejores resultados que con otros medios en la búsqueda directa de *Enterococcus*.²⁰ El agar Slanetz-Bartley es una modificación del agar m-E, basada en la inclusión del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio en la formulación, la cual resulta ser superior al anterior en cuanto a la enumeración de *Enterococcus*.²¹

El agar enterococcosel es una modificación del medio agar bilis esculina que consiste en la reducción de la concentración de bilis de buey de 40 a 10 g/L y la adición de azida de sodio. Se emplea para el aislamiento selectivo rápido, cultivo y

enumeración de *Enterococcus* y el caldo enterococcosel para su cultivo y diferenciación.⁹ El caldo azida etil violeta (caldo EVA) es utilizado para el aislamiento, cultivo y enumeración de *Enterococcus* de aguas y otras muestras.⁹

El medio azida esculina con kanamicina es otro de los productos disponibles comercialmente para el aislamiento y enumeración de *Enterococcus* presentes en alimentos, aguas y otras muestras.² En el medio, estos microorganismos crecen como resultado de la hidrólisis de la esculina, y producen colonias rodeadas de un halo de color negro. A pesar de que contiene kanamicina y azida de sodio, como agentes selectivos, los *Lactobacillus mesófilos*, que también hidrolizan la esculina, pueden crecer parcialmente. El método prevé la incubación a 37 °C durante 24 h; sin embargo, un incremento de la temperatura a 42 °C y la disminución del tiempo a 18 h aumenta la selectividad de este, aunque no se logra inhibir el crecimiento de *Lactobacillus esculina* positivos. Este problema podría resolverse incrementando la concentración de azida de sodio; pero ese incremento no es recomendable, ya que disminuye la razón de recuperación de *Enterococcus*.⁷ Para el aislamiento de especies de *Enterococcus* de alimentos de origen animal, se recomienda incubar el medio a 42 °C durante 24 h.⁶

Medios como el agar y el caldo *Streptococcus KF*, el agar de MacConkey No. 2 y el agar de MacConkey sin cristal violeta también son aplicados para la detección de *Enterococcus*.² El agar KF es utilizado específicamente para la enumeración de *Enterococcus* de aguas y alimentos no lácteos,⁵ aunque puede ser empleado para productos lácteos elevando la temperatura de incubación a 44 °C.¹⁴ El medio contiene TTC; es relativamente rico en maltosa (2 % p/v) y posee lactosa en menor proporción (0,1 % p/v).⁵ Algunos *Enterococcus* y *Streptococcus* son capaces de fermentar estos azúcares y crecer en el medio; sin embargo, la intensidad en la reducción del TTC varía entre las diferentes especies. Por ejemplo, *E. faecalis* produce colonias con un fuerte color rojo, mientras que otras especies de *Enterococcus* y *Streptococcus* producen colonias más pequeñas y de color rosado brillante.² La formulación, a pesar de contener azida de sodio, no es selectiva para *Enterococcus*, ya que otros microorganismos, como *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Aerococcus* pueden crecer desarrollando colonias rosadas brillantes. El método de cultivo requiere de un período de incubación de 48 h a 37 °C. Este producto puede ser utilizado para el examen de la microbiota del queso, pero requiere de una incubación durante 2 días a 44 °C.¹⁴ El agar de Pfizer selectivo para *Enterococcus* se recomienda para el aislamiento selectivo y cultivo de *Enterococcus* por la técnica de tubos múltiples.⁹

El medio leche, extracto de levadura y jugo de tomate se utiliza para el cultivo y mantenimiento de una variedad de bacterias fastidiosas, las cuales requieren factores de crecimiento complejos, dentro de las que se incluyen las especies de *Enterococcus*.⁹ Además, existe el agar CATC para la identificación de *Enterococcus* en carnes, derivados cárnicos, productos lácteos y otros alimentos, y el medio BACTO SF para la detección de *Streptococcus* fecales en leche, aguas, aguas residuales y heces.^{1,19}

El agar BARNES permite el aislamiento y enumeración de *Enterococcus* en alimentos, aguas y otros materiales.²² Sobre este medio las colonias de *Enterococcus* crecen de mediano tamaño y muestran una coloración que va de rosada pálido a rosada fuerte; sin embargo, también pueden crecer especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* como colonias de pequeño tamaño que no pueden distinguirse de *Enterococcus*.¹⁶

El medio agar arabinosa aztreonam cefalexina y el agar KF son medios para *Enterococcus* que basan su funcionamiento en la fermentación de azúcares contenidos en la formulación, y provocan un cambio de coloración de los

indicadores como resultado de la acidificación que producen algunas especies que pueden metabolizarlas. Aunque en estos medios pueden crecer especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, donde muchas de ellas exhiben la misma reacción, el grado de selectividad es diferente en cada uno de estos productos, ya que en el primero estas especies no pueden distinguirse de *Enterococcus*, como sucede también en el agar m-E, mientras que en el segundo, no se puede diferenciar la especie *Pediococcus dextrinicus*. De manera similar, en el medio agar kanamicina esculina azida, los *Lactobacillus* y *Pediococcus* son positivos a la hidrólisis de la esculina, por lo que estos no se pueden diferenciar de *Enterococcus*. Sin embargo, otros medios, como el agar azida carbonato tween citrato, poseen un mayor grado de selectividad, ya que solo crecen *Enterococcus*, los cuales muestran colonias de rosado a rosado oscuro de variados tamaños.^{2,16}

Como se evidencia, en la mayoría de estos medios, a pesar de ser estos selectivos para el género *Enterococcus* y basarse en diferentes principios, desde reacciones de hidrólisis de determinados componentes, como la esculina, hasta reacciones de fermentación de azúcares, pueden crecer especies pertenecientes a otros géneros y muchas veces no pueden diferenciarse de *Enterococcus*. Otra desventaja que poseen algunos de ellos es que requieren de períodos de incubación prolongados, a veces hasta de 3 o más días, lo cual incide negativamente en el diagnóstico. En la tabla 1 se recogen algunos de los principales medios convencionales para *Enterococcus* (cuadro 1).

Tabla 1. Medios de cultivo convencionales para *Enterococcus*

Nombre	Fabricante	Propósito y principio	Promotores de crecimiento	Inhibidores	Comentarios
Agar CATC (Citrato Azida Tween® Azida Carbonato)	Merck, Darmstadt, (Alemania)	Medio selectivo para la identificación de <i>Enterococcus</i> en carne, productos cárnicos, productos de desecho y otros productos alimenticios. ¹¹ La identificación se basa en la reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.	Triptona Extracto de levadura Tween® 80 Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio	Elevadas concentraciones de citrato de sodio Azida de sodio	Contiene azida de sodio, que es una sustancia altamente tóxica
Agar sangre Azida	BBL, (EE.UU.) Fluka, (Alemania)	Detección de <i>Enterococcus</i> en aguas y productos de desecho. ^{10,11}	Sangre de carnero Peptonas, extracto de carne Cloruro de sodio	Azida de sodio	No es selectivo para <i>Enterococcus</i> . La azida de sodio es tóxica
Medio leche Azul de metileno	-	Para el cultivo y diferenciación de <i>Enterococcus</i> de otras especies de <i>Streptococcus</i> . ¹⁴	Leche descremada Azul de metileno	-	No es un medio selectivo para <i>Enterococcus</i>
Agar de MacConkey No. 2	Oxoid, (Inglaterra)	Modificación del medio original agar de MacConkey útil para el reconocimiento de <i>Enterococcus</i> , en presencia de coliformes y de microorganismos no fermentadores de lactosa en aguas, aguas residuales y productos alimenticios. ¹³ Se basa en la producción de ácido como resultado de la fermentación de la lactosa, formación de colonias rojas por parte de estreptococos fecales.	Peptona Lactosa	Cristal violeta Sales biliares No. 2	Las sales biliares son irritantes para las vías respiratorias.

Cuadro 1. Medios de cultivo convencionales para *Enterococcus*

Nombre	Fabricante	Propósito y principio	Promotores de crecimiento	Inhibidores	Comentarios
Caldo Azida Púrpura de Bromocresol	Merck, Darmstadt, (Alemania)	Confirmación de <i>Enterococcus</i> en el análisis bacteriológico de las aguas. ¹¹ La fermentación de la glucosa provoca el viraje del púrpura de bromocresol a amarillo. Turbiedad y color amarillo en el caldo indica la presencia de <i>Enterococcus</i> .	Bases nutritivas Glucosa	Azida de sodio	Se emplea después de la prueba preliminar con caldo dextrosa azida. ³⁰ La azida de sodio es altamente tóxica. Se incuba hasta 48 h.
Caldo Triptona Soya con 6,5 % de cloruro de sodio	BBL, (EE.UU.) bioMérieux, (Francia)	Diferenciación de <i>Enterococcus</i> de otros <i>Streptococcus</i> del grupo D no <i>Enterococcus</i> . ²⁹ Los microorganismos tolerantes a la concentración de sal crecerán produciendo turbiedad en el caldo.	Mezcla de bases nutritivas Dextrosa	Cloruro de sodio	No es selectivo para <i>Enterococcus</i> , otros microorganismos pueden crecer.
Agar de Pfizer Selectivo para <i>Enterococcus</i>	BD, (EE.UU.) Titan Biotech Limited, Delhi, India	Medio recomendado por la APHA para el aislamiento selectivo y cultivo de <i>Enterococcus</i> por la técnica de tubos múltiples en muestras de agua. ¹³	Mezcla de peptonas Extracto de levadura Esculina	Azida de sodio Bilis	Es una pequeña modificación del medio agar bilis esculina azida. La azida de sodio es tóxica.
Medio de Slanetz y Bartley	Oxoid, (Inglaterra)	Detección y enumeración de <i>Enterococcus</i> por filtración por membrana a partir de muestras de agua y otros líquidos. ¹² Requiere una identificación confirmativa posterior en agar bilis esculina azida. ²⁰ La reducción de TTC produce colonias rojas, marrón o rosa.	Triptosa Extracto de levadura Glucosa Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio	Azida de sodio	Incubar a 44-45 °C disminuye los falsos positivos. La azida de sodio es altamente tóxica.
Caldo Dextrosa Azida	BBL, (EE.UU.) Merck, Darmstadt, (Alemania) Oxoid, (Inglaterra)	Detección de estreptococos fecales en aguas y desechos. Se emplea en la técnica de tubos múltiples. Para prueba preliminar de la presencia de <i>Enterococcus</i> en aguas, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria, y también para su enriquecimiento selectivo. ^{9,11,12}	Peptonas Extracto de carne Dextrosa Cloruro de sodio (equilibrio osmótico)	Azida de sodio	Medio de identificación presuntiva. La presencia de <i>Enterococcus</i> debe confirmarse en el caldo azida púrpura de bromocresol. ³ Requiere de 24-48 h de incubación.

DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS EMPLEADOS EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Aunque se continúan empleando los medios convencionales, a partir de la década de los 80 se han venido desarrollado técnicas para la detección y diferenciación de bacterias basadas en la utilización de sustratos cromogénicos y fluorogénicos, para revelar las actividades enzimáticas específicas de diferentes microorganismos.^{23,24} Son métodos muy sensibles que permiten obtener resultados más exactos y rápidos, lo cual constituye un ahorro de tiempo al no ser necesario el procedimiento de aislamiento previo a la identificación.²⁴ Sin embargo, a pesar de sus innumerables ventajas, estos productos no han reemplazado el uso de los medios convencionales en el diagnóstico de rutina; incluso existen requerimientos establecidos en diferentes normas internacionales que describen y definen a muchos de los medios convencionales como parte de los métodos oficiales, aunque no eliminan la posibilidad de utilizar los métodos alternativos.²⁵

CARACTERÍSTICAS DE LOS SUSTRATOS FLUOROGÉNICO Y CROMOGÉNICO

El uso de sustratos fluorogénicos para la detección de enzimas bacterianas fue propuesto por primera vez por *Dyer* en el año 1970.²⁶ Estos generalmente están compuestos por un determinado sustrato para la enzima específica, ya sea para azúcares o aminoácidos, y un grupo fluorógeno como el 4-metilumbelliferyl, que hace posible la observación de la emisión de fluorescencia al incidir la luz de longitud de onda de 366 nm. Los sustratos de la metilumbeliferona son solubles en agua, altamente sensibles y muy específicos. Por su dependencia del pH, su fuerte difusión por el medio sólido y la necesidad del empleo de la luz ultravioleta, el uso de estos sustratos es limitado.²⁷

Los sustratos cromogénicos son compuestos que se encuentran unidos a un grupo cromógeno que es liberado por la acción de las enzimas específicas, y provocan un cambio de color por la acción de la enzima microbiana. En 1987, *Bascomb* describió detalladamente las rutas sintéticas, tanto de los sustratos fluorogénicos como cromogénicos, y su aplicación para el estudio de las enzimas microbianas.²³

Manafi, en 1990, refirió cuatro grupos de compuestos cromogénicos basados en sus reacciones químicas. Los derivados del indolil son solubles en agua, estables a altas temperaturas y no muestran difusión en la placa de agar. Sus derivados más comunes son: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil (X), 5-bromo-6-cloro-3-indoxil (Magenta) o 6-cloro-3-indoxil (Salmón).²⁷

Dentro de las reacciones fluorogénicas y cromogénicas que más frecuentemente se emplean, se encuentra la hidrólisis de los sustratos sintéticos por parte de las enzimas microbianas, que causan un incremento considerable de la fluorescencia y/o absorción de la mezcla bacteria-sustrato. Los sustratos de este tipo más comunes son los sustratos sintéticos fluorogénicos de enzimas específicas que contienen derivados cumarínicos del 4-metilumbelliferyl (4-MU) o 7-amino-4-metilcumarin (7-AMC).²³

El uso de sustratos cromogénicos y fluorogénicos para la detección de la actividad β -D-glucosidasa para diferenciar *Enterococcus* ha recibido considerable atención. El 4-metilumbelliferil- β -D-glucósido, es uno de los sustratos fluorogénicos que se utilizan para este propósito; cuando es hidrolizado por la enzima β -D-glucosidasa de *Enterococcus*, se desprende 4-metilumbeliferona, la cual exhibe fluorescencia azul-verdosa cuando se ilumina con una lámpara de luz ultravioleta (366 nm). Enterolert™ (IDEXX Laboratorios Inc, Westbrook, ME, USA), microtiterplate MUST® (Biorad, Marnes-la-Coquette, Francia) contienen MUG que es utilizado por la enzima β -D-glucosidasa.²

MEDIOS DE CULTIVO CROMOGÉNICOS Y/O FLUOROGÉNICOS PARA *ENTEROCOCCUS*

El medio fluorogénico agar carbonato de talio gentamicina (fGTC) contiene el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- α -D-galactósido y almidón, ingredientes que le confieren al medio propiedades diferenciales, y permiten la diferenciación de *Streptococcus bovis* y *E. faecium* de otras especies de *Enterococcus* y *Streptococcus* basada en la hidrólisis del almidón y la presencia de fluorescencia.⁹ El medio no es específico para el género *Enterococcus*. En este la hidrólisis del almidón y la fluorescencia indican la presencia de *S. bovis*. La ausencia de hidrólisis del almidón con la emisión de fluorescencia es indicativa de *E. faecium* y biotipos relacionados y la ausencia de ambas reacciones indica crecimiento de *E. faecalis*, *E. avium*, *S. equinus* y otros estreptococos.⁸

El indoxil- β -D-glucósido es uno de los sustratos cromogénicos que se utiliza para detectar la actividad glucosidasa. Fue incorporado por *Dufour*, en 1980, al medio agar m-EI para detectar *Enterococcus*. Como resultado se produce un complejo insoluble azul índigo que difunde alrededor del medio y se forma un halo azul alrededor de la colonia que permite identificar estos microorganismos. Este medio ha sido modificado y ha reducido el contenido de TTC de 0,15 a 0,02 g/L.²⁸

El medio agar Chromocult® *Enterococcus* (Merck, Darmstadt, Alemania) es uno de los medios cromogénicos que se utilizan para el aislamiento, diferenciación y enumeración de *Enterococcus* en aguas, productos alimenticios y otros materiales. El crecimiento de *Enterococcus* en este medio se ve favorecido por la inclusión de peptonas, fosfatos y Tween 80. Contiene, además, azida de sodio y bilis de buey que inhiben el crecimiento de la mayoría de la microbiota acompañante; sin embargo, pueden crecer las especies de *Aerococcus viridans* (incoloras o azul/violeta) y *Streptococcus equi* (turquesa). No obstante, estas especies pueden

distinguirse fácilmente de las colonias rojas características de *Enterococcus* y que varían desde 0,5 a 2 mm de diámetro. Las especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* pueden crecer sin poder distinguirlas de *Enterococcus*.¹⁶ Este producto ha sido evaluado en comparación con el Agar MRS (Merck) para el aislamiento e identificación de *Enterococcus* en pollos de ceba, y se ha obtenido un 98 % de sensibilidad. No obstante, se encontraron diferencias significativas en cuanto a las razones de los aislamientos de *Enterococcus* entre ambos medios, donde fue pobre el crecimiento de algunas especies de *Enterococcus* en el medio cromogénico y se encontraron además resultados falsos positivos en este tipo de muestras que correspondieron a cepas de *Leuconostoc* spp.²⁹

El caldo Chromocult® *Enterococcus* es utilizado para el enriquecimiento selectivo de *Enterococcus* en el examen bacteriológico de las aguas. Contiene el sustrato cromogénico X-GLU (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucopiranosido) que es escindido por la enzima β-glucosidasa, y se produce un intenso color azul-verde en el caldo cuando hay presencia de *Enterococcus* y *Streptococcus* del grupo D en la muestra que se analiza.⁴ Este medio, a pesar de contener azida de sodio, no es capaz de inhibir el crecimiento de otras bacterias β-glucosidasa positivas, como *Streptococcus bovis*, y no se puede diferenciar de las especies de *Enterococcus*.³⁰

El agar RAPID *Enterococcus*® (Biorad, Marnes-la-Coquette, Francia) es otro medio que contiene el sustrato X-GLU, que permite detectar la actividad glucosidasa. Este diagnosticador contiene una mezcla de inhibidores que actúa sobre el crecimiento de microorganismos Gram-negativos y de otras bacterias β-D-glucosidasa positivas.²

De igual modo existen medios cromogénicos para la detección de *Enterococcus* de muestras clínicas, en especial de muestras de orina, donde se incluye el sustrato X-GLU.³¹

El medio cromogénico MPO® se recomienda para la detección, enumeración e identificación de patógenos del tracto urinario; dentro de ellos *los Enterococcus*. Los resultados de los recuentos y los tipos de microorganismos aislados en el MPO® han sido comparados con los que se obtienen en el medio C.L.E.D., que resultan ser análogos, aunque en algunos casos la presencia de *Enterococcus* spp. solo se detectó en el medio cromogénico. Este diagnosticador no es específico para el género *Enterococcus*, ya que crecen otros patógenos urinarios importantes como, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., enterobacterias del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* spp. y *Candida albicans*. Como ventaja se plantea que su utilización conlleva una importante disminución de la carga de trabajo asociada a la realización de esta técnica.³²

El chromID VRE (bioMérieux, Francia) es un nuevo medio cromogénico selectivo que refuerza el aislamiento e identificación presuntiva de *Enterococcus vancomicina* resistente directamente de hisopados rectales. Con este medio se reduce el tiempo de ensayo, al no ser necesaria la confirmación, lo cual es de vital importancia para el control de la diseminación de resistencia a la vancomicina.³³ Este producto ha sido evaluado en comparación con otros medios cromogénicos, como el VRE Agar (AES VRE agar; AES Chemunex) y el Agar VRE (Oxoid), con muestras de heces fecales para el propósito antes mencionado. Todos ellos muestran valores de sensibilidad muy bajos tanto en el cultivo directo (77,8, 66,7 y 44,4 %, respectivamente) como después de haber enriquecido la muestra en un caldo de enriquecimiento (83,3, 66,7 y 77,8 %, respectivamente). De todos ellos, el medio perteneciente a la firma Oxoid es el que tiene mayor dificultad para la interpretación de los resultados por la difusión de la coloración negra que muestran las colonias.³⁴

De igual modo, el medio chromID VRE (bioMérieux, Francia) ha sido evaluado para este mismo propósito con el medio Agar bilis esculina, con resultados similares a las 48 h, aunque con el medio cromogénico se obtiene mayor porcentaje de recuperación de EVR a las 24 h (39,3 % *versus* 21,3 %, P-0,003) por lo que su utilización resulta muy conveniente en el control de estas infecciones.¹⁵

En el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen, Cuba) se ha desarrollado el primer medio cromogénico del país para el aislamiento, identificación y recuento de *Enterococcus* en muestras clínicas. Ha sido evaluado con muestras clínicas (urocultivos, vaginales, hemocultivos, coprocultivos, uretrales y endocervicales), y se han obtenido valores elevados de sensibilidad (100 %), especificidad (96,19 %) y exactitud diagnóstica (93 %) para el total de las muestras ensayadas, valores estos superiores a los reportados con otros medios cromogénicos como el chromID VRE (bioMérieux, Francia), VRE Agar (AES VRE agar; AES Chemunex) y el Agar VRE (Oxoid).^{33,35}

También fue desarrollado el medio cromogénico m-CromoCen ENT, que se deriva de pequeñas modificaciones de la formulación anterior, y que se destina al aislamiento de estos microorganismos en muestras de agua por la técnica de filtración por membrana.³⁶ En la tabla 2 y en el cuadro 2 aparece un resumen de algunos de los principales medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos para *Enterococcus*.

Tabla 2. Medios de cultivo cromogénicos-fluorogénicos para *Enterococcus*

Nombre del Medio	Fabricante	Propósito y principio	Promotores de crecimiento	Inhibidores	Comentarios
Agar m-EI	BBL, (EE.UU.)	Enumeración de <i>Enterococcus</i> en aguas marinas y aguas frescas por la técnica de filtración por membrana. Se utiliza en el método 1600 aprobado por la Agencia de Protección del Medio ambiente de los Estados Unidos. ²⁸ Las cepas de <i>Enterococcus</i> producen colonias rodeadas de un halo azul.	Bases nutritivas	Azida de sodio Cicloheximida ácido nalidixico	El medio fue modificado por Messer y Dufour en 1988 con el objetivo de disminuir el tiempo de detección a 24 horas. ²⁸ La azida de sodio es tóxica.
Agar RAPID ¹ <i>Enterococcus</i>	Sanofi Pasteur, (Francia) Fluka, (EE.UU.) Sigma-Aldrich, (EE.UU.)	Detección de <i>Enterococcus</i> , es selectivo por la inhibición de bacterias Gram-negativas y otras bacterias β-glucosidasa positivas. ³⁷ Especialmente útil para muestras de agua. ²	Bases nutritivas	Azida de sodio	La azida de sodio es tóxica.
CromoCen ENT	BioCen (Cuba)	Medio cromogénico para el aislamiento, identificación y recuento de las especies del género <i>Enterococcus</i> de varios tipos de muestras. ²⁴	Triptosa Xilosa	Acetato de talio	No posee azida de sodio. No posee sangre ni antibióticos en su composición.

Cuadro 2. Medios de cultivo cromogénicos-fluorogénicos para *Enterococcus*

Nombre del Medio	Fabricante	Propósito y principio	Promotores de crecimiento	Inhibidores	Comentarios
Agar CPS ID2	bioMérieux (Francia)	Aislamiento e identificación directa de los patógenos más frecuentes del tracto urinario. ³¹ Detecta de forma directa de cuatro actividades metabólicas: β -glucuronidasa, β -glucosidasa, desaminasa y producción de indol.	Bases nutritivas Tryptófano	-	Sensibilidad de 97 % y especificidad de 99 % en la identificación de <i>Enterococcus</i> .
CHROMagar orientation medium	Becton Dickinson (EE.UU.)	Aislamiento, diferenciación y enumeración de patógenos urinarios. Diferenciación e identificación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus</i> sin necesidad de pruebas confirmatorias. ² Detección de actividades enzimáticas específicas. Colonias azules de <i>Enterococcus</i> , como puntos de alfiler después de 18 h.	Peptona	-	No es selectivo para <i>Enterococcus</i> , crecen otros microorganismos. <i>Escherichia coli</i> produce colonias rojas.
Medio UriSelect 3	Sanofi Diagnostic Pasteur (Francia)	Detección, enumeración e identificación directa de patógenos urinarios, entre ellos bacterias del género <i>Enterococcus</i> spp. ^{9,31} Detección de β -glucuronidasa, β -glucosidasa y producción de indol. ⁹	Peptonas Tryptófano	-	No es selectivo para <i>Enterococcus</i> , pueden crecer otros microorganismos como las enterobacterias.
Medio Chromogenic UTI	Oxoid (Inglaterra)	Detección, enumeración e identificación directa de patógenos urinarios, entre ellos <i>Enterococcus</i> spp. ^{2,31}	Bases nutritivas Fenilalanina y triptófano	-	No es selectivo para <i>Enterococcus</i> ya que pueden crecer otros microorganismos.
Medio Agar Rainbow UTI	Biolog (EE.UU.)	Se basan en la detección de actividades enzimáticas específicas y desaminación del triptófano.			

CONSIDERACIONES FINALES

El género *Enterococcus* ha sufrido variaciones en su clasificación. Antiguamente se encontraban incluidos dentro del género *Streptococcus*; sin embargo, en la actualidad se reconocen como un género independiente. Existe un número considerable de medios de cultivo para el aislamiento e identificación de las especies de *Enterococcus*; sin embargo, no existe un medio universal para el aislamiento de estos microorganismos, por lo que la selección del tipo de medio a emplear depende de la muestra que se desee analizar y de su microbiota acompañante; tampoco son medios sencillos debido a los requerimientos nutricionales que poseen estos microorganismos. Muchos de estos productos no son específicos para el género pues, en ellos pueden crecer otros microorganismos, por lo que es difícil distinguirlos de *Enterococcus*, ya que en muchos casos exhiben la misma reacción de degradación de los glucósidos. Para lograr mejores resultados en cuanto a la selectividad, muchos de estos diagnosticadores contienen antibióticos que afectan su estabilidad y otros inhibidores, que son sustancias altamente tóxicas para la salud humana y para el medio ambiente, por lo que necesitan ser manipulados con precaución y requieren de condiciones especiales para su fabricación o descarte. Por otra parte, en muchos casos es necesario variar las concentraciones de los agentes inhibidores en el medio o variar las condiciones de incubación (temperatura y tiempo) para lograr un mayor grado de selectividad; sin embargo, esto conlleva una menor razón de recuperación de *Enterococcus*. En muchos casos un método de cultivo no es suficiente para la correcta identificación de las especies o del género y se necesitan de pruebas fenotípicas y genotípicas adicionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Davis JM, Huycke MM, Wells CL, Bohnen MA, Bohnen J, Dominick G. et al. Surgical Infection Society position on Vancomycin-Resistant *Enterococcus*. Arch Surg. 1996; 131(10): 1061-8.

2. Konrad JD, Helmut KM, Wolfgang K. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. *Internat J Food Microbiol.* 2003; 88(2-3):147-64.
3. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Microbiological examination of water. En: Greenberg AE. Standard method for the examination of water and wastewater. Washington DC: APHA, AWWA, WEF; 1992. p. 9-73.
4. Giraffa G. *Enterococci* from foods. *FEMS Microbiol.* 2002;26(2):163-71.
5. Reuter G. Selective media for group D-*Streptococci*. *Int J Food Microbiol.* 1985;2(1-2):103-14.
6. Devriese LA, Pot B, Van Damme L, Kersters K, Haesebrouck F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int J Food Microbiol.* 1995;26(2):187-97.
7. Reuter G. Culture media for *Enterococci* and group D-*Streptococci*. *Int J Food Microbiol.* 1992;17(2):101-11.
8. Littel KJ, Hartmann PA. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of faecal *Streptococci*. *Appl Environ Microbiol.* 1983;45(2):622-27.
9. Atlas RM. Handbook of microbiological media for the examination of food. Boca Ratón, USA: CRC Press; 2006.
10. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. Nueva York: Editorial Médica Panamericana SA; 1991. p. 304-8.
11. Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM. Handbook of Culture Media for Food Microbiology. Amsterdam: Elsevier; 1999. p. 51-60.
12. Mead GC. Isolation media for group D *Streptococci*: comments. *Int J Food Microbiol.* 1985;2(1-2):115-17.
13. Reuter G. Culture media for *Enterococci* and group D-*Streptococci*. *Internat J Food Microbiol.* 1992;17(2):101-11.
14. Hartman PA, Deibel RH, Sieverding LM. *Enterococci*. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, DC: American Public Health Association; 1992. p. 523-31.
15. Grabsch EA, Ghaly-Derias S, Gao W, Howden BP. Comparative Study of Selective Chromogenic (chromID VRE) and Bile Esculin Agars for Isolation and Identification of vanB-Containing Vancomycin-Resistant *Enterococci* from Feces and Rectal Swabs. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):4034-36.
16. Weiss A, Domig KJ, Kneifel W. Selective Media for Enumeration of Probiotic *Enterococci*. *Food Technol. Biotechnol.* 2005;43(2):147-55.
17. Isenberg HD, Goldberg J, Sampson J. Laboratory studies with a selective *Enterococcus* medium. *Appl Environ Microbiol.* 1970;20(3):433-36.
18. Volterra L, Bonadonna L, Aulicino FA. Comparison of methods to detect fecal *Streptococci* in marine waters. *Wat, Air Soil Pollut.* 1985;26(2):201-10.

19. Difco & BBL Manual II. Manual of Microbiological Culture Media [Internet]. Maryland, USA: Becton, Dickinson and Company; 2009 [cited 24 Sep 2011]. Available from: http://www.brunswick-ch.com/pdf/special_offers/BD_DifcoManual_Aktion.pdf
20. Burkwall MK, Hartman PA. Comparison of direct plating media for the isolation and enumeration of *Enterococci* in certain frozen foods. *Appl Microbiol.* 1964;12(1):18-23.
21. Bahirathan M, Puente L, Seyfried P. Use of yellow-pigmented *Enterococci* as a specific indicator of human and nonhuman sources of faecal pollution. *Can J Microbiol.* 1998;44(11):1066-71.
22. Neaves P, Waddell MJ, Prentice GA. A medium for the detection of Lancefield Group D cocci in skimmed milk powder by measurement of conductivity changes. *J Appl Bacteriol.* 1988;65(6):437-48.
23. Manafi M, Kneifel W, Bascomb S. Fluorogenic and Chromogenic Substrates used in Bacterial Diagnostics. *Microbiol Mol Biol.* 1991;53(3):335-48.
24. Orenga S, James AL, Manafi M, Perry JD, Pincus DH. Review Enzymatic substrates in microbiology. *J Microbiol Meth.* 2009;79(2):139-55.
25. Norma Española UNE-EN ISO 7899-2. Calidad del agua. Detección y recuento de *Enterococos* intestinales. Parte 2: Método de filtración por membrana (ISO 7899-2: 2000). CTN: AEN/CTN 77/SC 1 - AGUA, Madrid: CTN; 2001.
26. Mohammed M, Wolfgang K, Shoshana B. Fluorogenic and Chromogenic Substrates Used in Bacterial Diagnostics. *Microbiol Reviews.* 1991;55(3):335-48.
27. Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol.* 2000; 60(2-3):205-18.
28. Messer JW, Dufour AP. A rapid, specific membrane filtration procedure for enumeration of *Enterococci* in recreational waters. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(2):678-80.
29. Miranda JM, Franco CM, Vázquez BI, Fente CA, Barros-Velázquez J, Cepeda A. Evaluation of Chromocult *Enterococci* agar for the isolation and selective enumeration of *Enterococcus* spp. in broilers. *Lett Appl Microbiol.* 2005;41(2):153-6.
30. Amoros I, Alonso J. Evaluation of Chromocult *Enterococci* Broth (with Agar). Posterpräsentation Congress of Spanish Society of Microbiology. Madrid: Spanish Society of Microbiology; 1995.
31. Carricajo A, Boiste S, Thore J, Aubert G, Gille Y, Freydiere AM. Comparative evaluation of five chromogenic media for detection, enumeration and identification of urinary tract pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18(11):796-803.
32. Palacios E, Rodríguez-Granjer J, Sampedro A, Martínez-Brocal A, De la Rosa-Fraile M. Utilidad del medio cromogénico MPO® en el procesamiento habitual del urocultivo. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20(8):388-90.
33. Cuzon G, Naas T, Fortineau N, Nordmann P. Novel Chromogenic Medium for Detection of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2442-44.

34. Asir K, Wilkinson K, Perry JD, Reed RH, Gould FK. Evaluation of chromogenic media for the isolation of vancomycin-resistant *Enterococci* from stool samples. *Letters in Applied Microbiology*. 2008; 48(2): 230-33.
35. Díaz M, Rodríguez C, Zhurbenko R, Hernández E, Muñoz del Campo JL, Bello O. Evaluación del Desempeño de un nuevo medio de cultivo en la búsqueda de *Enterococcus* en muestras clínicas. *Rev CENIC Cienc Biol*. 2005; 36(No. Especial): 1-6.
36. Díaz M, Rodríguez C, Zhurbenko R, Govín Y. Identificación de *Enterococcus* como indicador más eficiente de las aguas utilizadas en los procesos biofarmacéuticos. Presentación en póster. *Bioteología'* Habana, 3-5 noviembre del 2009, La Habana: Palacio de las Convenciones; 2009.

Recibido: 6 de junio de 2012.

Aprobado: 20 de noviembre de 2012.

MSc. *Marilyn Díaz Pérez*. Departamento de Investigaciones de Medios de Cultivo, Centro Nacional de Biopreparados. Apartado 6048, Habana 6, CP 32600. La Habana, Cuba. Correo electrónico: marilyn.diaz@biocen.cu