

Evaluación del medio xilosa galactosidasa (XG®) para el aislamiento de enteropatógenos

Guillermo Ruiz, María José Uría, Alicia Rico y Concepción Ladrón de Guevara

Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario La Paz. Madrid. España.

INTRODUCCIÓN. Evaluar y comparar el medio cromogénico XG® con respecto a los medios habituales utilizados en coprocultivos para el aislamiento de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* y *Aeromonas* spp.

MÉTODOS. Se estudiaron un total de 1.226 muestras de heces que se inocularon en los medios XG®, MacConkey, Salmonella-Shigella (SS), caldo selenito, agar sangre-ampicilina y cefsulodina-irgasan-novobiocina (CIN).

RESULTADOS. Se obtuvieron 235 cultivos positivos: *Salmonella* spp. (229), *Shigella* spp. (3), *Yersinia enterocolitica* (2) y *Aeromonas* spp. (1). De los 229 aislamientos de *Salmonella* spp., cien procedían del medio XG® como de los medios habituales y los 129 restantes se recuperaron sólo en estos últimos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) para la recuperación de *Salmonella* spp. procedentes de los medios rutinarios con respecto al XG®. Los tres aislamientos de *Shigella* spp. se recuperaron únicamente del medio XG®, los dos de *Yersinia enterocolitica* del medio CIN y el de *Aeromonas* spp. tanto del medio XG® como del medio agar sangre-ampicilina. En 791 muestras negativas se trabajaron colonias compatibles con alguno los enteropatógenos valorados. Estos falsos positivos procedían del medio XG® 441 (35,9%), del pase a SS del selenito 142 (11,6%), del medio MacConkey 132 (10,8%) y del medio SS de la siembra directa 76 (6,2%). La mayor parte de los falsos positivos procedentes del medio XG® correspondieron a aislamientos compatibles con *Salmonella* spp. ($n = 408$).

CONCLUSIONES. El medio cromogénico XG® mostró baja sensibilidad (64%) y especificidad (69%) para el aislamiento de *Salmonella* spp. Los tres aislamientos de *Shigella* spp. recuperados del medio XG® pudieron deberse al inmediato procesamiento de la muestra. Consideramos que el medio cromogénico XG® no puede sustituir a los medios habituales utilizados en coprocultivo.

Palabras clave: Enteropatógenos. Medios de cultivo. Medios cromogénicos. XG®.

Evaluation of xylose galactosidase (XG®) culture medium for the isolation of enteropathogens

INTRODUCTION. The chromogenic medium, XG®, was evaluated and compared to conventional media for the isolation of *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas* spp.

METHODS. A total of 1226 human stool samples were inoculated on XG®, MacConkey agar, Salmonella-Shigella agar (SS), selenite broth, blood-ampicillin agar and cefsulodin-Irgasan-novobiocin agar (CIN).

RESULTS. The 235 positive cultures included the following: 229 *Salmonella* spp., 3 *Shigella* spp., 2 *Yersinia enterocolitica* and one *Aeromonas* spp. Among the 229 containing *Salmonella* spp., 100 were detected on both XG® and conventional media and the 129 remaining were detected only on conventional media; recovery of *Salmonella* spp. on conventional media was significantly higher with respect to XG® medium ($p < 0.005$). The 3 isolates of *Shigella* spp. were obtained on XG®, the 2 isolates of *Yersinia enterocolitica* were recovered on CIN agar and the single isolate of *Aeromonas* spp. was obtained both on XG® and blood-ampicillin agar. Colonies suspected to be some of the enteropathogens investigated were present in 791 of the negative stool samples. Among these false-positives 441 (35.9%) were obtained from XG®, 142 (11.6%) after selenite enrichment, 132 (10.8%) from MacConkey agar and 76 (6.2%) from SS agar. Most of the false-positive isolates obtained on XG® medium were consistent with *Salmonella* spp. ($n = 408$).

CONCLUSIONS. XG® chromogenic medium showed low sensitivity (64%) and specificity (69%) for the detection of *Salmonella* spp. Recovery of *Shigella* spp. on XG® medium in three samples may have been due to the immediate processing of the samples. We conclude that XG® chromogenic medium can not be recommended as an alternative to currently used conventional media.

Key words: Enteropathogens. Culture media. Chromogenic media. XG®.

Introducción

La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades infecciosas atendida con más frecuencia en las urgencias de los hospitales y representa además un importante reto para la salud pública, tanto en países desarrollados como

Correspondencia: Dra. C. Ladrón de Guevara.
Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica.
Hospital Universitario La Paz.
Pº de la Castellana, 261. 28046 Madrid. España.
Correo electrónico: cladrón.hulp@salud.madrid.org

Manuscrito recibido el 27-8-2003; aceptado el 29-1-2004.

en vías de desarrollo¹. Aunque los principales enteropatógenos causantes de diarrea aguda varían según el grupo de población, destacan por su frecuencia bacterias como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp. y *Aeromonas* spp., agentes virales como rotavirus, adenovirus y astrovirus y algunos parásitos como *Giardia intestinalis* o *Cryptosporidium* spp.²⁻⁴. Debido a la elevada morbilidad que representa esta enfermedad es muy importante disponer de medios diagnósticos sensibles y específicos.

La aparición de medios cromogénicos y fluorogénicos han permitido avances significativos en la formulación de medios de cultivo diferenciales, los cuales detectan caracteres fenotípicos bacterianos que ponen de manifiesto la presencia de enzimas características de grupos taxonómicos que orientan hacia la identificación presuntiva⁵. Estos medios incluyen en su composición compuestos cromogénicos o fluorogénicos habitualmente incoloros que son sustratos de enzimas específicas. Cuando la enzima actúa sobre el sustrato, éste sufre un cambio estructural, formándose un nuevo compuesto coloreado (cromóforo) o fluorescente⁶. En los últimos años han aparecido diversos medios cromogénicos (CHROMagar *Salmonella*, BBL CHROMagar *Salmonella*, medio ABC, agar Rambach, SMID) útiles para el aislamiento e identificación presuntiva de *Salmonella* spp., pero no de otros enteropatógenos.

El nuevo medio de cultivo agar xilosa galactosidasa (XG® Tec-Laim, España) es un medio cromogénico, diferencial y moderadamente selectivo diseñado para el aislamiento y la identificación temprana de algunos patógenos entéricos: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas* spp. y *Yersinia enterocolitica*⁷. Se compone de sustratos que ponen de manifiesto la actividad betagalactosidasa, gracias al componente cromogénico fundamental 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido, y la fermentación de xilosa de manera simultánea⁸. Además contiene sales biliares y novobiocina que impiden el crecimiento de bacterias grampositivas y de *Proteus* spp., respectivamente.

El objetivo de este trabajo es evaluar y comparar la sensibilidad y la especificidad del medio XG® con respecto a los medios habituales utilizados en los coprocultivos para el aislamiento de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas* spp. y *Y. enterocolitica*. Así mismo, pretendemos conocer el ahorro de tiempo en el aislamiento e identificación de estos enteropatógenos con el citado medio.

TABLA 1. Aislamientos de *Salmonella* spp. (n = 229) recuperados en los distintos medios

Medios	XG® positivo	XG® negativo
MacConkey	—	—
SS	2	1
Selenito	1	38
MacConkey + SS	27	2
MacConkey + selenito	—	1
SS + selenito	4	62
MacConkey + SS + selenito	66	25
Total	100	129

SS: *Salmonella-Shigella*.

Material y métodos

Se analizaron un total de 1.226 muestras de heces recibidas en horario de guardias en nuestro servicio de microbiología durante el período comprendido entre mayo de 2000 y diciembre de 2001. Las muestras se recogieron en un contenedor sin medio de transporte y se sembraron en el medio XG® en el momento de su recepción y entre las 12-72 h siguientes en los medios habituales para coprocultivos: MacConkey, *Salmonella-Shigella* (SS), selenito, cefsulodina-irgasan-novobiocina (CIN) y agar sangre-ampicilina. Estos medios constituyeron el estándar frente a los cuales se calcularon la sensibilidad y especificidad del medio evaluado. La siembra se realizó mediante descarga directa con torunda de una suspensión compuesta por 1-2 g de muestra en agua destilada. El caldo selenito se subcultivó en agar SS tras 18 h de incubación. Las colonias compatibles con *Salmonella* spp. o *Shigella* spp. en los medios MacConkey y/o SS: lactosa negativas productoras o no de sulfhídrico, se inocularon en medio hierro triple azúcar (TSI). Aquellos aislados fermentadores de glucosa, no fermentadores de sacarosa y lactosa, productores de gas y sulfhídrico se aglutinaron con el antisuero frente *Salmonella* spp. (Difco) y los que presentaron el patrón fermentadores de glucosa, no fermentadores de sacarosa y lactosa, no productores de gas ni sulfhídrico fueron aglutinadas con antisuero frente *Shigella* spp. (Difco). Las colonias compatibles con *Yersinia* spp. crecidas en el medio CIN se aglutinaron con *Agglutinating sera for grouping of Y. enterocolitica* 0:3 y 0:9® (Biorad), antisuero que permite serotipar *Y. enterocolitica* 0:3 y 0:9. Las colonias en agar sangre-ampicilina productoras de hemólisis compatibles con *Aeromonas* spp., se inocularon en medio TSI, se les realizó el test de la citocromo oxidasa (Remel), indol y bilis esculina antes de proceder a la identificación. La identificación definitiva de todos los enteropatógenos citados anteriormente se realizó mediante el sistema automático Wider® (Francisco Soria Melguizo, España).

El medio XG® se incubó en aerobiosis a 37 °C realizándose la lectura en las 18-72 h siguientes. Las características cromogénicas del medio permiten la diferenciación de cuatro tipos de colonias: rosa (xilosa positiva, betagalactosidasa negativa) compatible con *Salmonella* spp., verde (xilosa negativa, betagalactosidasa positiva) compatible con *Aeromonas* spp., *Y. enterocolitica* y *Shigella sonnei*, ámbar (xilosa negativa, betagalactosidasa negativa) para otras especies de *Shigella* y azul (xilosa positiva, betagalactosidasa positiva) para el resto de la flora. Aquellas colonias compatibles con alguno de los patrones de color rosa, verde o ámbar fueron inoculadas en el medio TSI, posteriormente se aglutinaron con el antisuero correspondiente o bien se realizó un subcultivo en agar sangre y el test de la citocromo oxidasa, indol y bilis esculina en el caso de obtener un patrón de color compatible con *Aeromonas* spp. (verde). La identificación se confirmó mediante el sistema automático Wider® (Francisco Soria Melguizo, España).

La significación estadística del aislamiento de *Salmonella* spp. con los diferentes medios utilizados se evaluó mediante el test de la chi cuadrado (χ^2) utilizando el paquete estadístico SPSS. Se consideró un nivel de significación estadística de $p < 0,005$.

Resultados

Durante el período de estudio, de los 1.226 coprocultivos procesados se obtuvieron 235 aislamientos de los patógenos valorados en este trabajo: en 229 se aisló *Salmonella* spp.; en tres, *Shigella* spp.; en dos, *Y. enterocolitica*, y en uno, *Aeromonas* spp.

De los 229 aislamientos de *Salmonella* spp., 100 procedían tanto del medio XG® como de los medios habituales, mientras que los 129 restantes se recuperaron exclusivamente de los medios habituales. En la tabla 1 se muestran las diferentes combinaciones de medios en los que fueron recuperados los aislamientos de *Salmonella* spp. Los tres aislamientos de *Shigella* spp. se recuperaron únicamente

del medio XG®, los dos de *Y. enterocolitica* sólo del medio CIN y el de *Aeromonas* spp. tanto del medio XG® como del medio agar sangre-ampicilina.

Por el contrario, se obtuvieron 991 muestras en las que no se aisló ningún enteropatógeno, en 791 de las mismas se trabajaron colonias compatibles con alguno de ellos. Estos falsos positivos (fig. 1) procedían: del medio XG®, 441 (35,9%); del pase del selenito, 142 (11,6%); del medio MacConkey, 132 (10,8%), y del medio SS, 76 (6,2%), refiriéndose el porcentaje respecto al número total de muestras ($n = 1.226$). Los falsos positivos encontrados con el medio CIN y agar sangre-ampicilina fueron de un aislamiento, respectivamente. En cuanto a los resultados falsos positivos del medio XG®, 408 presentaron un patrón de color (rosa) compatible con *Salmonella* spp., 13 un patrón de color (verde) compatible con *Aeromonas* spp., *Y. enterocolitica* y *S. sonnei* y, por último, sólo un aislamiento compatible con *Shigella* spp. distinto de *S. sonnei* (color ámbar).

La sensibilidad y especificidad de los distintos medios utilizados en rutina y del medio XG® para el aislamiento de *Salmonella* spp., que fue el aislado más frecuente, se muestra en la tabla 2.

Se realizaron comparaciones del medio XG® con los medios MacConkey ($\chi^2 = 114,90$; $p < 0,005$), SS ($\chi^2 = 33,39$; $p < 0,005$) y selenito ($\chi^2 = 33,34$; $p < 0,005$) y se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la recuperación de *Salmonella* spp. en los medios rutinarios respecto al XG®.

Discusión

Los medios MacConkey, SS y selenito utilizados en la práctica habitual mostraron mayor sensibilidad y especificidad que el medio XG® para el aislamiento y recuperación de *Salmonella* spp. El medio MacConkey es un medio ligeramente selectivo debido a que la concentración de sales biliares que contiene es menor respecto a la de otros medios entéricos; por ello, presentó una sensibilidad más baja (68%) comparándolo con el resto de medios habituales. El medio SS presentó una sensibilidad del 85% y resultó ser el medio más específico de todos (93%) para el aislamiento de *Salmonella* spp., lo cual es lógico al tratarse de un medio muy selectivo por su contenido en sales biliares, verde brillante y citratos. El caldo selenito fue el más sensible de todos los medios (88%) para la recuperación de *Salmonella* spp. La elevada sensibilidad del caldo selenito es atribuible a su capacidad como medio selectivo de enriquecimiento; a pesar de ello hubo 32 aislamientos de *Salmonella* spp. que no fueron recuperados del selenito y sí del medio SS, sólo (3 aislados) o en combinación con MacConkey (29 aislados) (tabla 1).

En nuestro estudio el medio XG® mostró una sensibilidad del 64% para el aislamiento de *Salmonella* spp. en relación a los medios habituales y presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) con respecto a los medios MacConkey, SS y selenito, este resultado es inferior al encontrado en un estudio similar realizado con el medio XG® en muestras clínicas positivas⁷ donde obtuvieron una sensibilidad del 78% en relación a los medios MacConkey, XLD y Hektoen para el aislamiento de *Salmonella* spp. En otro trabajo realizado con 75 muestras ar-

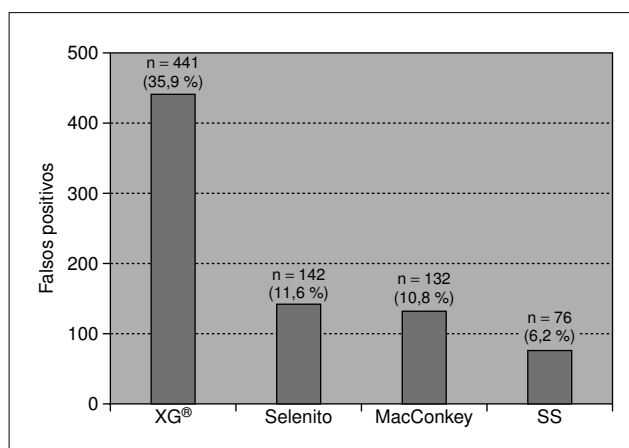


Figura 1. Muestras trabajadas de heces ($n = 791$) con colonias compatibles en las que no se aisló ningún enteropatógeno (porcentaje con respecto al total de muestras). SS: *Salmonella-Shigella*.

TABLA 2. Sensibilidad y especificidad de los diferentes medios para el aislamiento de *Salmonella* spp.

	XG®	MacConkey	SS	Selenito
Sensibilidad (%)	64	68	85	88
Especificidad (%)	69	88	93	87

SS: *Salmonella-Shigella*.

tificialmente contaminadas⁸ se comparó la sensibilidad del medio XG® con respecto a los medios Rambach para el cultivo de *Salmonella* spp. y se encontró una sensibilidad del 88% para el medio XG®, muy superior a la obtenida para el medio Rambach (57%).

Respecto a los tres únicos aislamientos de *Shigella* spp. se recuperaron sólo del medio XG®. Esta circunstancia pudo deberse al inmediato procesamiento de la muestra, lo que permitió el aislamiento de este enteropatógeno de labilidad extrema. En sendos trabajos, García-Aguayo et al obtuvieron una sensibilidad del medio XG® para el aislamiento de *S. sonnei* en muestras artificialmente contaminadas del 75⁷ y del 76%⁸ con respecto a los medios XLD, MacConkey y Hektoen.

Respecto a los dos aislamientos de *Y. enterocolitica* serotipo O:3, se recuperaron únicamente del medio CIN. Este serotipo (xilosa negativa) debería ser fácilmente diferenciable del resto de flora normal en el medio XG®, al contrario de lo que ocurre con otros serotipos (xilosa positivos) de *Y. enterocolitica* y con la mayoría de las especies de *Yersinia*. El medio XG® se comportó de manera equivalente al medio agar sangre-ampicilina en la recuperación del único aislamiento de *Aeromonas* spp.

En este estudio, realizado con muestras clínicas, el medio cromogénico XG® mostró baja sensibilidad (64%) y especificidad (69%) para el aislamiento de *Salmonella* spp., por lo que no debe ser utilizado como único medio para su recuperación en muestras de heces. El bajo número de aislamientos obtenidos de *Shigella* spp., *Y. enterocolitica* y *Aeromonas* spp. no permite obtener conclusiones sobre la utilidad de las distintas placas utilizadas para su aislamiento, así como del medio XG®.

Con respecto a los otros medios no mejoró la discriminación de falsos positivos (fig. 1), no disminuyó los tiempos y los recursos técnicos necesarios para el aislamiento e identificación de los distintos enteropatógenos. Por tanto, consideramos que el medio cromogénico XG® no puede sustituir a los medios habituales utilizados en coprocultivo.

Bibliografía

1. Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev Infect Dis* 1990;12(Suppl 1):S41-S50.
2. Gracey M. Bacterial diarrhoea. *Clin Gastroenterol* 1986;15:21-37.
3. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:247-62.
4. Katz DE, Taylor DN. Parasitic infections of the gastrointestinal tract. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:797-815.
5. Palacios E, Rodríguez-Granjer J, Sampedro A, Martínez-Brocal A, De la Roza-Fraile M. Utilidad del medio cromogénico MPO® en el procesamiento habitual del urocultivo. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:388-90.
6. Manafi M. New development in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiology* 2000;60:205-18.
7. García-Aguayo JM, Úbeda P, Gobernado M. Evaluation of Xylose-Galactosidase Medium, a New Plate for the Isolation of *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* and *Aeromonas* Species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:77-8.
8. García-Aguayo JM, Merino MJ. Sensibilidad del medio XG para el aislamiento de *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996;14:400-1.