

Evaluación de la peptona papaínica de corazón de res para el enriquecimiento selectivo de *Enterococcus*

Evaluation of beef heart papainic peptone for selective enrichment of *Enterococcus*

Lic. Ivonne Alfonso Valdés,¹ Lic. Marilyn Díaz Pérez,¹¹ Lic. Manuel Medell Gago,¹¹ Dra. C. Raisa Zhurbenko,¹ Dr. C. Claudio Rodríguez Martínez¹

¹Centro Nacional de Biopreparados (BioCen), Bejucal. Mayabeque. Cuba.

¹¹Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: El control microbiológico de aguas y alimentos ha motivado el desarrollo de medios de cultivo selectivos capaces de detectar *Enterococcus*, los cuales necesitan de una fuente de energía apropiada para garantizar la recuperación de estos.

Objetivos: Comparar diferentes bases nutritivas elaboradas a partir de productos y subproductos alimenticios según su capacidad de promoción de crecimiento del género *Enterococcus* y evaluar la exactitud del medio de cultivo caldo azida dextrosa.

Métodos: Para el ensayo se seleccionaron 80 cepas de diferentes géneros. Se prepararon dos variantes experimentales del caldo azida dextrosa (una tamponada) y se inocularon los microorganismos seleccionados a una concentración estandarizada. El incremento de la biomasa se determinó midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro a 640 nm cada una hora. La evaluación microbiológica del medio de cultivo se realizó utilizando diferentes géneros microbianos a distintas concentraciones. Se determinó la sensibilidad, especificidad, exactitud diagnóstica y relativa y el índice Kappa del diagnosticador. Como medio de referencia se utilizó el caldo azida glucosa proveniente de la firma comercial Merck (Alemania).

Resultados: La producción de biomasa de las especies de enterococos evaluadas resultó superior con respecto a los otros géneros, siendo mayor en la formulación tamponada. De igual forma, esta logró un efecto inhibitorio superior sobre los controles negativos ensayados. El medio de cultivo mostró resultados satisfactorios de sensibilidad, especificidad y exactitud diagnósticas (97,7; 94,6; 96,3 %, respectivamente) y relativas (100; 89,8; 94,8 % respectivamente). Estos valores

fueron superiores a los obtenidos con el medio de referencia. Los índices Kappa estuvieron en el rango de "casi perfecta".

Conclusiones: Con la base nutritiva obtenida del corazón de res, subproducto de la industria alimenticia (peptona papaínica de corazón de res) se obtiene un mejor crecimiento del género *Enterococcus* y una mayor exactitud en la formulación donde se encuentra como fuente principal de nutrientes.

Palabras clave: Caldo azida dextrosa, *Enterococcus*, cepas aisladas, bases nutritivas.

ABSTRACT

Introduction: microbiological control of water and food has motivated the development of selective culture media capable of detecting *Enterococcus*, which need an appropriate source of energy to ensure the recovery of microorganisms.

Objectives: compare different nutrient bases produced from food products and by-products according to their growth promotion capacity for the genus *Enterococcus*, and evaluate the accuracy of dextrose azide broth culture medium.

Methods: eighty strains of different genera were selected for the test. Two experimental variants of dextrose azide broth were prepared (one buffered) and the microorganisms selected were inoculated at a standardized concentration. Biomass increase was determined by measuring optical density in a spectrophotometer at 640 nm every 1 h. Microbiological evaluation of the culture medium was carried out using different microbial genera at different concentrations. Diagnostic and relative sensitivity, specificity and accuracy, and the Kappa index were determined for the culture medium. Glucose azide broth (Merck, Germany) was used as reference medium.

Results: the *Enterococcus* species evaluated showed higher biomass production than the other genera. The buffered formulation showed maximum growth of culture and this medium exhibited a higher inhibitory effect on the strains selected as negative control bacteria. The culture medium showed satisfactory results for diagnostic sensitivity, specificity and accuracy (97.7; 94.6; 96.3 %, respectively) and relative sensitivity, specificity and accuracy (100; 89.8; 94.8 %, respectively). These values were higher than those obtained with the reference medium. Kappa indices were ranged as "almost perfect".

Conclusions: With the nutrient base obtained from beef heart, a by-product from the food industry (beef heart papainic peptone), better growth of the genus *Enterococcus* is obtained, as well as higher accuracy in the formulation when it is used as the main source of nutrients.

Key words: dextrose azide broth, *Enterococcus*, isolates, nutrient bases.

INTRODUCCIÓN

La importancia que tiene el control microbiológico de aguas y alimentos ha motivado el desarrollo de medios de cultivo selectivos capaces de detectar el género *Enterococcus* en diferentes muestras, debido a que son considerados indicadores apropiados de contaminación de origen fecal,¹ ya que estas bacterias forman parte de

la microbiota normal del intestino de algunos animales (incluyendo el hombre) y son persistentes a condiciones ambientales adversas.²

Aunque no existe un indicador universal para evaluar la calidad sanitaria de las aguas se reporta que los enterococos son útiles para valorar las destinadas al consumo humano^{3,4} y recreación (incluyendo el agua de mar)^{4,5} y a pesar de su baja virulencia, el aumento de su aplicación como indicador de calidad, está dado por reportes recientes que muestran una relación entre el riesgo de contraer enfermedades gastrointestinales y la presencia de estos microorganismos en ellas.⁶

En Cuba se desarrolló por primera vez, en el Centro Nacional de Biopreparados, un medio de cultivo para la detección y enriquecimiento selectivo de *Enterococcus*. El caldo azida dextrosa se utiliza en la técnica del número más probable,² como caldo de enriquecimiento selectivo y presuntivo el cual debe garantizar un desarrollo eficiente de microorganismos en baja concentración inicial y con condiciones ambientales desfavorables, así como inhibir el desarrollo de otros géneros que no son de interés.^{7,8}

Los medios de cultivo tienen una composición general, dentro de la cual las bases nutritivas, que se obtienen a partir de sustratos ricos en proteínas mediante procesos de extracción o hidrólisis, se consideran como componentes básicos por los aportes de sustancias nitrogenadas, como elementos indispensables para el metabolismo microbiano.^{9,10} La peptona de caseína y el extracto de carne se obtienen de proteínas consideradas fuentes de alimento de alto valor nutritivo (de la caseína y la carne de res respectivamente), por otro lado, la peptona, representante de las bases nutritivas por su contenido de diferentes fracciones de proteínas, puede ser elaborada a partir del corazón de la res, el cual es un subproducto de la industria alimenticia.^{9,11} Por todo esto es necesaria la búsqueda de una fuente de energía apropiada y económica que sea capaz de promover el crecimiento y recuperar eficientemente estos microorganismos.

Un método que se utiliza para comparar diferentes bases nutritivas es la determinación del aumento de la absorbancia de un cultivo en el tiempo, según los valores registrados con un espectrofotómetro.¹¹⁻¹³ Para evaluar la capacidad de recuperación e inhibición del medio de cultivo elaborado, se empleó el método de inoculación por diluciones.

El objetivo del estudio consistió en comparar diferentes bases nutritivas elaboradas a partir de productos y subproductos alimenticios, según su capacidad de promoción de crecimiento del género *Enterococcus* y evaluar la exactitud del medio de cultivo caldo azida dextrosa, al emplear peptona papaínica de corazón de res como principal fuente de nutrientes.

MÉTODOS

Para la comparación de las bases nutritivas se utilizaron cepas microbianas de American Type Culture Collection (ATCC), procedentes del cepario central de BioCen: *Enterococcus faecalis* 29212, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922.

Se diseñaron dos variantes con las siguientes composiciones (g/L): la variante 1 (V1) con peptona de caseína 15,0 g (BioCen, Cuba); extracto de carne 4,5 g (Biotécnica Internacional, México); dextrosa 7,5 g (AppliChem, Alemania); azida de sodio 0,2 g y cloruro de sodio 7,5 g (Merck, Alemania) y pH 7,2 ± 0,2 y la variante 2 (V2) con peptona papaínica de corazón de res 20,0 g (BioCen, Cuba); dextrosa 5,0 g; fosfato

dipotásico 2,7 g; fosfato monopotásico 2,7 g (AppliChem, Alemania); azida de sodio 0,2 g y cloruro de sodio 5,0 g (Merck, Alemania) y pH $6,8 \pm 0,2$.

Las dos composiciones preparadas se dispensaron en tubos de cultivo con tapa de rosca (150 x 15 mm) en cantidad de 10 mL y se esterilizaron por autoclave (Lequex Automatic AUV M0076, Francia) a un régimen de 121 °C por 15 min.

Se emplearon cultivos puros de las cepas seleccionadas incubados durante 24 h en caldo cerebro corazón (BioCen, Cuba). Cada cultivo se estandarizó a DO_{580} de 0,5 (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL) con un espectrofotómetro (T70/T70+UV-VIS, England) en una solución salina estéril al 0,85% (p/p). Los caldos se inocularon con una alícuota de 0,1 mL de la suspensión microbiana estandarizada y se incubaron a 35 ± 2 °C. Se le midió su densidad óptica a 640 nm, cada una hora, hasta completar las nueve primeras horas, luego a las 24 y 48 h de incubación.

El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa Microsoft Excel, 2007 Windows Xp Sp3.

La evaluación de la eficiencia del medio de cultivo caldo azida dextrosa se realizó con 80 cepas microbianas de diferentes géneros, entre ellas 41 cepas de referencia de las colecciones ATCC y National Collection of Industrial, Food and Marina Bacteria (NCIMB) y 39 cepas aisladas del género *Enterococcus* (tabla 1). De estas últimas, 7 cepas aisladas de *Enterococcus*, procedentes de muestras de aguas, se identificaron en los laboratorios de microbiología de BioCen por un conjunto de pruebas bioquímicas (citocromo oxidasa, catalasa, bilis esculina, crecimiento a 45 °C, tolerancia a la sal, fermentación del piruvato, crecimiento en caldo Chromocult®, oxidación-fermentación de carbohidratos, crecimiento a pH 9,6, Voges-Proskauer, movilidad, indol, ácido sulfhídrico, hidrólisis de arginina). Las restantes 32 cepas aisladas de muestras clínicas (Hospital clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras") se identificaron con el sistema de identificación rápida VITEK® (bioMérieux, Francia) y las tarjetas ID-GP (bioMérieux, Francia).

Tabla 1. Cepas aisladas utilizadas para la evaluación microbiológica del medio de cultivo

Microorganismo	Cantidad	Código de procedencia
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	ATCC 29212, ATCC 19433, IND1, POT4, HHA1, HHA2, HHA5, HHA6, HHA7, HHA8, HHA9, HHA11, HHA12, HHA14, HHA16, HHA18, HHA20, HHA22, HHA25, HHA26, HHA27, HHA28, HHA29, HHA32
<i>Enterococcus faecium</i>	13	ATCC 19434, IND2, PISC5, PISC6, HHA3, HHA4, HHA10, HHA13, HHA15, HHA17, HHA21, HHA24, HHA31
<i>Enterococcus avium</i>	1	ATCC 14025
<i>Enterococcus</i> sp.	3	POT3, PISC7, HHA23

<i>Enterococcus gallinarium</i>	2	HHA19, HHA30
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	ATCC 9959
<i>Streptococcus equis</i>	1	ATCC 33398
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	ATCC 33397
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	ATCC 6538, ATCC 25923
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	ATCC 29770
<i>Proteus mirabilis</i>	1	ATCC 12453
<i>Proteus inconstans</i>	1	ATCC 9836
<i>Proteus regtteri</i>	1	ATCC 29544
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	ATCC 13883
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	ATCC 43663
<i>Escherichia coli</i>	2	ATCC 11775, ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1	ATCC 35150
<i>Citrobacter diversus</i>	1	ATCC 27156
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	ATCC 25405
<i>Citrobacter freundii</i>	1	ATCC 8090
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	ATCC 9027, ATCC 27853
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1	NCIMB 1102
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	ATCC 7966
<i>Aeromonas veroni</i>	1	ATCC 35624
<i>Aeromonas bestiarum</i>	1	ATCC 51108
<i>Aeromonas caviae</i>	1	ATCC 15468
<i>Aeromonas culicicola</i>	1	ATCC 3249
<i>Aeromonas jandae</i>	1	ATCC 49568
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	ATCC 13111
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	ATCC 13076
<i>Salmonella typhi</i>	1	ATCC 19430
<i>Serratia marcescens</i>	2	ATCC 14576, ATCC 13880
<i>Serratia odorifera</i>	1	ATCC 33077
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	ATCC 13048
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	ATCC 233355

<i>Enterobacter cancerogenes</i>	1	ATCC 3341
<i>Shigella flexneri</i>	1	ATCC 12028
<i>Shigella sonnei</i>	1	ATCC 25931
Total	80	

ATCC: American Type Culture Collection, NCIMB: National Collection of Industrial, Food and Marina Bacteria, IND: cepas aisladas de muestras de agua industrial, POT: cepas aisladas de muestras de agua potable, PISC: cepas aisladas de muestras de agua de piscina), HHA: cepas aisladas de muestras clínicas del Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras".

Se utilizaron el medio caldo azida dextrosa (BioCen, Cuba) (experimental) que contenía como base nutritiva peptona papaínica de corazón de res y el caldo azida glucosa (Merck, Alemania) como medio control, preparados según las indicaciones de los fabricantes. Este último se escogió por tener en su composición peptona de caseína y extracto de carne como fuente de energía.

Cada cepa se estandarizó partiendo de un cultivo puro, proveniente de un caldo cerebro corazón (BioCen, Cuba), incubado por 24 h. Se utilizó el patrón de MacFarland 1 y solución salina estéril al 0,85 % (p/p) hasta alcanzar una carga de aproximadamente 3×10^8 UFC/mL. A partir de la suspensión estandarizada se realizaron diluciones decimales seriadas para inocular los medios de cultivo preparados. Se utilizaron para el ensayo tres tubos en paralelo de ambos medios de cultivo, los cuales se inocularon con concentraciones entre 10-100 UFC para los microorganismos pertenecientes al género *Enterococcus* y entre 3×10^4 - 3×10^5 UFC para los microorganismos pertenecientes a otros géneros y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 h.

Se consideró un resultado positivo para aquellos tubos que presentaron una turbidez dada al crecimiento microbiano y negativo al observarse transparencia o ligera opalescencia en el caldo. En este último caso los medios se incubaron nuevamente hasta 48 h.

Se calcularon los valores de sensibilidad (S), especificidad (E) y exactitud (Ex) diagnósticas para cada medio de cultivo de acuerdo con su capacidad de detectar o inhibir las cepas seleccionadas y además la sensibilidad (S_r), especificidad (E_r) y exactitud (Ex_r) relativas según la habilidad de cada diagnosticador de detectar un mismo microorganismo. Los valores de sensibilidad y especificidad diagnósticas y relativas se determinaron según la prueba de McNemar recomendada por Iltrup (1990)¹⁴ y los valores de exactitud por la suma de los acuerdos positivos con los negativos divididos entre la suma de los acuerdos positivos y negativos y las desviaciones positivas y negativas. El índice Kappa se estableció por el método recomendado por Sim and Wright (2005).¹⁵

RESULTADOS

Las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* mostraron un crecimiento favorable en ambas formulaciones del medio de cultivo, respecto a los otros géneros probados (Fig.) La V2 proporcionó una mejor recuperación de *E. faecalis* en comparación con la V1, alcanzando valores de densidad óptica a 640 nm de 1,375 y 1,016, respectivamente, a las 24 h de incubación del cultivo.

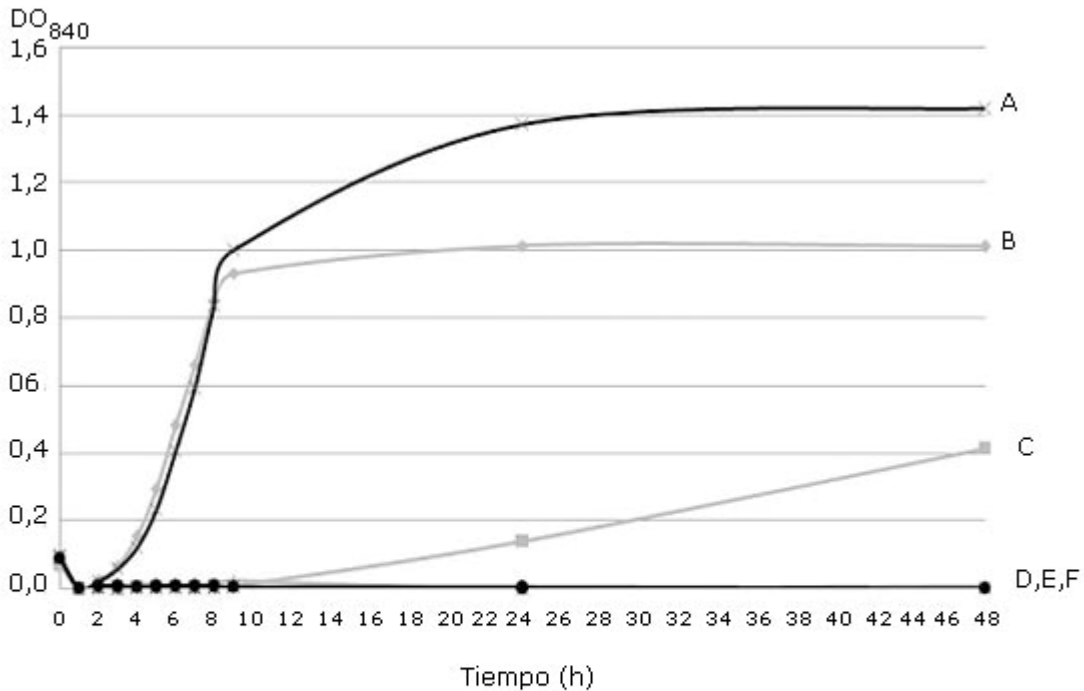


Fig. Efecto de las bases nutritivas sobre el aumento de la biomasa de microorganismos en el tiempo. A: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con peptona papaínica de corazón de res 20,0 g; dextrosa 5,0 g; fosfato dipotásico 2,7 g; fosfato monopotásico 2,7 g; azida de sodio 0,2 g; cloruro de sodio 5,0 g; pH 6,8 (V2); B: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con peptona de caseína 15,0 g; extracto de carne 4,5 g; dextrosa 7,5 g; azida de sodio 0,2 g; cloruro de sodio 7,5 g; pH 7,2 (V1); C: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y D: *Escherichia coli* ATCC 25922 en la V1; E: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y F: *Escherichia coli* ATCC 25922 en la V2.

La V2 presentó un mayor efecto inhibitor de los microorganismos empleados como control negativo. En la V1, *S. aureus* mostró un aumento de biomasa microbiana, expresada en valores de densidad óptica a 640 nm de 0,142 en 24 h y hasta 0,417 en 48 h. Sin embargo, este microorganismo no mostró un incremento de su biomasa durante su cultivo en la V2, donde el valor de densidad óptica no superó 0,03 tanto a las 24 como a las 48 h de incubación. Para *E. coli* no se obtuvo el incremento de biomasa en ambas variantes.

De 43 microorganismos aislados del género *Enterococcus*, inoculados en los medios de cultivo, 28 fueron detectados en el caldo azida dextrosa experimental a las 24 h de incubación y las 14 restantes a las 48 h. En el caldo azida glucosa ensayado como control a las 24 h se detectaron 20 cepas y las restantes 18 cepas resultaron detectables a las 48 h de incubación (tabla 2). No se obtuvo crecimiento del aislamiento codificado con IND1 (especie *E. faecalis*) en ninguno de los medios de cultivo analizados. Las muestras codificadas con HHA4, HHA13, HHA21 y HHA31, todas de la especie *E. faecium*, no mostraron crecimiento en el medio de cultivo control a las 48 h de incubación.

De las otras 37 cepas probadas, no pertenecientes al género *Enterococcus*, 35 resultaron inhibidas en ambas formulaciones de medios de cultivo.

Las cepas *Streptococcus pyogenes* ATCC 9959 y *Streptococcus anginosus* ATCC 33397 resultaron desviaciones positivas en las formulaciones experimental y control, ya que ambas mostraron una turbiedad en los tubos inoculados, pero en menor grado que la obtenida con el género *Enterococcus* (tabla 2). El efecto inhibitorio estuvo más acentuado en el medio de cultivo control.

La sensibilidad diagnóstica para las formulaciones experimental y control resultó $97,67 \pm$ y $88,37 \pm$ %, respectivamente. Para la especificidad diagnóstica se obtuvieron valores de $94,60 \pm$ % para ambos medios de cultivo. La exactitud diagnóstica de la combinación experimental ($96,25 \pm$ %) superó al de la formulación control ($91,25 \pm$ %) (tabla 2).

El índice Kappa en ambos medios alcanzó valores de 0,95 para el medio de cultivo experimental y 0,83 para el medio control (tabla 2).

La tabla 2 muestra también la correspondencia de los resultados obtenidos con el medio de cultivo control (referencia) y el experimental (alternativo). Los valores de la sensibilidad, especificidad y exactitud relativas resultaron 100; 89,74 y $94,80 \pm$ %, respectivamente. El índice Kappa resultó igual a 0,90 (tabla 2).

Tabla 2. Comparación de los medios de cultivo caldo azida dextrosa (BioCen) y caldo azida glucosa (Merck) según los valores de sensibilidad, especificidad, exactitud diagnósticas y relativas y el índice Kappa

Parámetros diagnósticos								
	AP	DN	DP	AN	S (%)	E (%)	Ex (%)	Kappa
CAD (BioCen)	42	1	2	35	97,67	94,60	96,25	0,95
CAG (Merck)	38	5	2	35	88,37	94,60	91,25	0,83
Parámetros relativos								
	AP	DN	DP	AN	S _r (%)	E _r (%)	Ex _r (%)	Kappa
CAD (BioCen)	38	0	4	35	100	89,74	94,80	0,90
CAG (Merck)								

CAD (BioCen, Cuba): caldo azida dextrosa, CAG (Merck, Alemania): caldo azida glucosa, AP: acuerdos positivos, DN: desviaciones negativas, DP: desviaciones positivas, AN: acuerdos negativos, S: sensibilidad diagnóstica, E: especificidad diagnóstica, Ex: exactitud diagnóstica, S_r: sensibilidad relativa, E_r: especificidad relativa, Ex_r: exactitud relativa.

DISCUSIÓN

El aumento de la densidad óptica de un cultivo en el tiempo es un criterio que se aplica en el diseño de los medios de cultivo, al evaluar el producto por la promoción de crecimiento microbiano, según la representación gráfica de los valores obtenidos.¹¹⁻¹³

La peptona papaínica de corazón de res (V2) promovió mejor el crecimiento del género *Enterococcus*, en comparación con la mezcla de peptona de caseína y extracto de carne (V1). Este resultado coincide con lo demostrado por Zhurbenko y col., en el 2012, los cuales reportan un óptimo crecimiento de este género en medios líquidos utilizando la peptona papaínica de corazón de res.¹¹

El crecimiento de *Enterococcus* está relacionado con la composición propia de la base nutritiva seleccionada debido al elevado porcentaje de nitrógeno amínico y nitrógeno total, como elementos indispensables para el metabolismo celular, y el contenido de macroelementos, microelementos, aminoácidos y sales.¹¹ En la segunda variante se logró el equilibrio en los cambios de pH debido a la inclusión en su composición de sustancias tampón.¹⁶

La positividad en el crecimiento de *Enterococcus* dependió del tiempo de incubación, logrando el crecimiento de 33,3 % de cepas a las 48 h en el medio experimental. Estos hallazgos evidencian la necesidad de incubar el medio de cultivo hasta las 48 h para evitar falsos negativos, resultados que coinciden con lo que plantean otros autores.²

El azida de sodio actúa sobre el hierro que contiene la proteína citocromo presente en la membrana plasmática de las bacterias, y afecta la transferencia de electrones, inhibiendo el crecimiento de aquellos microorganismos que sintetizan ATP por esta vía, sin afectar el crecimiento del género *Enterococcus*. A pesar de esto se plantea que con este compuesto como parte de la formulación del medio de cultivo puede observarse un crecimiento de otros microorganismos de diferentes géneros frente a este inhibidor.¹ resultado que se obtuvo en este estudio con el crecimiento de dos cepas del género *Streptococcus*.

La superioridad en los valores de sensibilidad y exactitud diagnósticas alcanzados en el medio experimental se debe a que esta formulación recuperó casi todas las especies de *Enterococcus* inoculadas, en una concentración de inóculo entre 10 y 100 UFC, debido a su composición nutricional.

El indicador de la especificidad diagnóstica sugiere la capacidad del medio experimental de descartar un amplio grupo de microorganismo no diana, al igual que el medio de referencia. Los dos medios de cultivo mostraron un acuerdo total en la inhibición de los microorganismos no diana, dado al poder inhibitorio de la azida de sodio que poseen los caldos formulados. Se ha reportado que este agente inhibidor es ampliamente utilizado en medios de cultivo, líquidos o sólidos, diseñados para obtener e identificar el género *Enterococcus*.¹

La exactitud diagnóstica garantiza que el medio de formulado con peptona papaínica de corazón de res es capaz de detectar o recobrar, de forma precisa, el microorganismo diana presente en una muestra y, a su vez, inhibir los microorganismos no diana, al igual que el medio experimental.

El índice Kappa evidencia el conjunto de concordancia entre los medios de cultivo para detectar el microorganismo. En ambos medios este índice mostró valores superiores a 0,81 lo que demuestra la fortaleza de los medios de cultivo para la

identificación del género *Enterococcus*, interpretándose como casi perfecto según los estándares propuestos por Landis y Koch, referido por Sim and Wright.¹⁵

Los valores de sensibilidad, especificidad y exactitud relativas mostraron la relación entre la respuesta obtenida en los dos medios de cultivo probados al analizar la misma muestra. El análisis de la sensibilidad relativa demostró que el medio alternativo posee la habilidad de detectar el microorganismo diana cuando este es detectado por el método de referencia.

La razón de que la desviación positiva resultó igual a 4, fue debido a que se encontraron falsos positivos en el medio de referencia, no ocurriendo así para la desviación negativa por no existir falsos negativos. El índice Kappa se interpreta como «casi perfecta» al igual que los obtenidos en los indicadores diagnósticos por ser mayor a 0,81,¹⁵ lo que representa la fortaleza del medio de cultivo experimental en comparación con el medio de referencia para promover el cultivo de los microorganismos de interés.

La sensibilidad relativa fue superior a la sensibilidad diagnóstica debido a que el medio de cultivo diseñado fue capaz de detectar todas las especies del género *Enterococcus* que se detectaron en el medio de cultivo de referencia.

El valor de especificidad relativa fue inferior al valor de especificidad diagnóstica ya que cuatro microorganismos del género diana fueron detectados como negativos por el método de referencia. Estos resultados son considerados como desviaciones positivas para el medio control lo que disminuye el valor de la especificidad relativa del medio experimental.

El valor de la exactitud relativa fue inferior al valor de exactitud diagnóstica calculado para el caldo azida dextrosa y refleja que la proporción de resultados positivos, confirmados por el medio alternativo, mostró diferencias con respecto a los alcanzados por el medio de referencia.

Se puede concluir que con la base nutritiva obtenida del corazón de res, subproducto de la industria alimenticia (peptona papaínica de corazón de res) se obtiene un mejor crecimiento del género *Enterococcus* y una mayor exactitud en la formulación donde se encuentra como fuente principal de nutrientes, en comparación con la combinación de peptona de caseína y extracto de carne, ambos productos considerados de alto valor en la industria alimenticia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz Pérez M, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. *Enterococcus*, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2013;51(1):97-110.
2. Díaz Pérez M, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2010;48(2):147-61.
3. Njie Ateba C, Duke Maribeng M. Detection of *Enterococcus* species in groundwater from some rural communities in the Mmabatho area. South Africa: A risk analysis. Afr J Microbiol Res. 2011;5(23):3930-5.

4. Staradumskytė D, Paulauskas A. Indicators of microbial drinking and recreational water quality. *Biologija*. 2012;58(1):713.
5. Salwa SM, Shaban AM, Kamel MM, Huda HE, Abada EA. New definite-substrate media for *Enterococci* detection in Nile water, Egypt. *J Appl Sci Res*. 2010;6(11):1801-6.
6. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. *Enterococci* in the environment. *Microbiol. Mol Biol Rev*. 2012;76(4):685-706.
7. Mallman WL, Seligmann EB. A comparative study of media for the detection of *Streptococci* in water and sewage. *AJPH*. 1950;40:286-9.
8. Litsky W, Mallmann WL, Fifield WC. A new medium for the detection of *Enterococci* in water. *AJPH*. 1953;43:873-9.
9. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. Bases nutritivas para el cultivo de los microorganismos: Parte 1-Procesos tecnológicos. *Salud(i)Ciencia*. 2008;16(4):420-5.
10. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. Bases nutritivas para el cultivo de los microorganismos: Parte 2 Principales indicadores de calidad. *Salud(i)Ciencia*. 2009;16(6):645-51.
11. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Lobaina Rodríguez T, López Hernández OD, Viera Oramas DR. Peptona papáinica de corazón de vaca como fuente de nutrientes para los microorganismos. *SIIC*. 2012 Septiembre 21 [citado 21 Ene 2013]. Disponible en: <http://www.siicsalud.com/dato/experto.php/113774>
12. Lobaina Rodríguez T, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Caracterización de un extracto de *Ipomoea batatas* para ser utilizado en calidad de base nutritiva en medios de cultivo. *Rev Cubana Med Trop*. 2007;59(3):218-26.
13. Viera Oramas DR, Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. Caracterización de un hidrolizado ácido de caseína. *Rev Cubana Med Trop* [online]. 2009;61(2) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000200005
14. Ilstrup DM. Statistical Methods in Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(3):219-26.
15. Sim J, Wright CC. The Kappa statistic in reliability studies: Use, interpretation and sample size requirements. *Phys Ther*. 2005;85(3):257-68.
16. Bridson EY, Brecker A. Design and formulation of microbial culture media. En: Norris JR, Ribbons DW, eds. *Methods in Microbiology*, V.3A. London: Academic Press; 1970.

Recibido: 26 de agosto de 2013.
Aprobado: 12 de septiembre de 2013.

Dra. *Ivonne Alfonso Valdés*. Centro Nacional de Biopreparados (BioCen), Bejucal. Mayabeque. Cuba. Correo electrónico: ivonne.alfonso@biocen.cu