

ESTUDIO Y EVALUACION DE UN METODO PRESUNTIVO DE IDENTIFICACION DE *Escherichia coli* MEDIANTE EL EMPLEO DE DISCOS FLUORESCENTES

A. Niebla Pérez y C. Pascual Marquí

Departamento de Diagnóstico Bioquímico y Microbiológico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN. Se trabajaron 101 cepas, 80 de *Escherichia coli* y 21 de otros géneros aislados de muestras clínicas provenientes de diferentes hospitales de la capital en el período comprendido entre Octubre de 1989 y Enero de 1990. A todas las cepas se les realizó la detección de la enzima β -Glucuronidasa en condiciones establecidas por nuestro laboratorio y se comparó con los resultados obtenidos por el método del enterotubo de la ROCHE. Del total de cepas de *Escherichia coli*, 75 fueron positivas a la prueba de la detección de la β -Glucuronidasa para un 94 % de sensibilidad y se obtuvo una especificidad del 100 %.

ABSTRACT. The enzyme β -Glucuronidase was detected in 101 strains (80 *Escherichia coli* and 21 from other genus) isolated from different hospitals, using a method established in our laboratory. The results were compared to reference method of Enterotube from La Roche. Out of all *E. coli* strains, 75 of them were positive to the test for a 94 % of sensitivity also obtaining a 100 % specificity.

INTRODUCCION

Es necesario encontrar métodos de diagnóstico que disminuyan los esfuerzos técnicos, el costo y el tiempo asociado con la identificación de los microorganismos, lo que podría mejorar la atención al paciente y disminuir los gastos del laboratorio.

La *Escherichia coli* es comunmente aislada de especímenes clínicos, especialmente del tracto urinario, donde su incidencia es del 80 %.¹⁻³ También es utilizada como indicador de contaminación fecal por presentarse en mayor número que otros coliformes y patógenos en las aguas.⁴ Ella constituye el único bacilo Gram negativo, fermentador de lactosa capaz de producir β -Glucuronidasa.^{2,3,5-10}

Así la presencia de esta enzima y una adecuada morfología (bacilos cortos Gram negativos que forman colonias fermentadoras de lactosa) son suficientes para identificar este microorganismo,^{2,3,8-10} lo que contribuiría a un ahorro de recursos y tiempo considerable.

Otras especies del género *Salmonella* y *Shigella* pueden producir β -Glucuronidasa pero no son fermentadoras de lactosa, lo que permitiría excluirlas.^{6,8-9}

Por todo lo antes expuesto nos propusimos desarrollar y evaluar un método rápido, sencillo y poco costoso para la identificación de *Escherichia coli* que pudiera introducirse en nuestra red hospitalaria.

MATERIALES Y METODOS

Cepas empleadas: una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 y otras 101 cepas provenientes de aislamientos de pacientes de diferentes centros hospitalarios: 36 cepas de *E. coli* aisladas en el Pediátrico "Juan Manuel Márquez" y 21 de otros géneros del mismo centro, 34 cepas de *E. coli* del Hospital Clínico Quirúrgico "Joaquín Albarrán", 5 cepas del hospital "Carlos J. Finlay", y 4 cepas de *E. coli* del hospital "William Soler".

Todas fueron identificadas por el método del Enterotubo de la ROCHE, que se empleó como método de referencia, y cultivadas en agar sangre, cuñas de agar nutriente, así como conservadas en Cistina Tripticasa Agar (CTA).

METODOS EMPLEADOS PARA LA DETECCION DE LA ENZIMA

Los métodos empleados para la detección de la enzima se basan en la reacción de la β -Glucuronidasa con el sustrato 4-metilumbelliferil- β -D-glucurónido (no fluorescente), liberándose metilumbelliferona, que fluoresce a pH alcalino.

Para la estandarización de las condiciones de la determinación enzimática se estudió el efecto de diferentes factores sobre la misma: concentración celular, tiempo de incubación y concentración del sustrato, empleándose en estos estudios el método A.

METODO A. 100 L de muestra más 200 μ L del sustrato 4-metilumbelliferil β -D-glucurónido (5,28 mg + 200 μ L dedimetilsulfóxido en 10 mL de PBS 0,01 M, pH 7,2) son incubados 30 min a 37°C. Se detiene la reacción enzimática por adición 800 L de buffer Carbonato de Sodio, 0,5 M, pH 10,7. Las lecturas en el fluorímetro fueron para una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 448 nm.

En la Figura 1 se muestra la curva de calibración de la metilumbelliferona para una concentración entre 0,03 a 0,3 M. En el eje de las abscisas se representan los ng/mL de 4-metilumbelliferona, y en el eje de las ordenadas las unidades de intensidad fluorescente (UIF). La recta de mejor ajuste tiene un coeficiente de regresión de 0,9979. Para el ajuste del fluorímetro se utilizó una solución de Sulfato de Quinina.

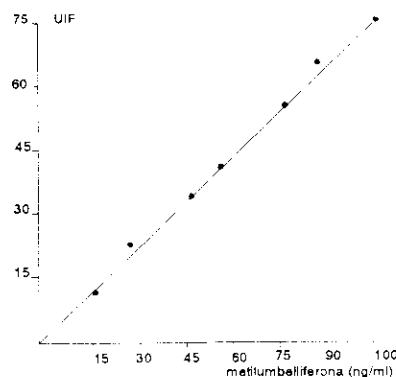


Fig 1. Curva de calibración con 4-metilumbelliferona.

Para la evaluación de la actividad enzimática en las cepas una vez que se estudió el Sistema, se utilizó el método B.

METODO B. 1 ó 2 colonias del germen son impregnadas sobre un disco que contiene el sustrato, se incuba 15 min a 37°C después de añadir una gota de agua para acelerar la reacción. Se detiene la reacción con NaOH 1 M (10 μ L), y se observa la fluorescencia bajo una lámpara de luz ultravioleta.

El resultado se clasificó según la intensidad fluorescente en 0, 1, 2 y 3 cruces.

Con el objetivo de cuantificar la fluorescencia observada en el método B se empleó el método A modificado, utilizando discos impregnados con el sustrato, en los que se colocaron 2 colonias de *E. coli*. El tiempo de incubación fue de 15 min. Este experimento se repitió 10 veces, para demostrar cuantitativamente las diferencias entre los discos controles y una muestra positiva.

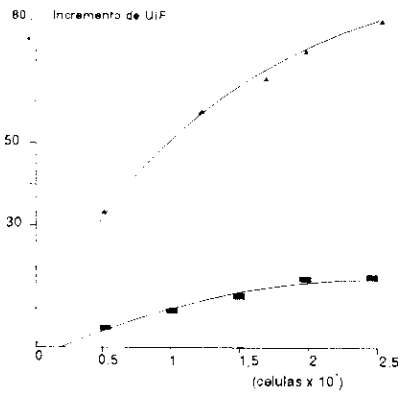


Fig 2. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. () Lecturas tomadas a los 30 min de incubación y () Lecturas tomadas a los 60 min de incubación.

El sustrato empleado es proveniente de la firma Koch-Light. Para la determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m),¹¹ se empleó el Método de Hanes¹¹.

Para la comprobación de la estabilidad de los discos se aplicó el Método B a 40 discos en total, que fueron conservados a 4°C, durante un período de 3 meses.

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL METODO

Se tomaron como verdaderos positivos (VP) a los identificados como *E. coli* por el método del Enterotubo y β -Glucuronidasa positivo (glu^+).

Se consideraron como verdaderos negativos (VN) a los identificados como no *E. coli* por el método del Enterotubo y (glu^-).

Los falsos positivos (FP) fueron aquellos identificados como no *E. coli* por el método del Enterotubo y (glu^+).

Los falsos negativos (FN) fueron aquellos identificados como *E. coli* por el método del Enterotubo y (glu^-).

$$\text{SENSIBILIDAD (S)} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

$$\text{ESPECIFICIDAD (E)} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO POSITIVO (PPV)} = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (PPN)} = \frac{VN}{VN + FN} \times 100$$

El estudio del efecto de la concentración celular sobre la actividad enzimática arrojó que la misma, entre 10^6 y 10^7 , es directamente proporcional a la actividad enzimática. Por encima de 10^7 se presenta una disminución de la velocidad debido posiblemente a un agotamiento del sustrato.

Este efecto se observa tanto para los 30 como los 60 min como se muestra en la Figura 2. En el eje de las abscisas se representa la cantidad de células empleadas ($\times 10^7$) y en las ordenadas las unidades de intensidad fluorescente con respecto al blanco.

La actividad enzimática en función del tiempo presenta un comportamiento sigmoideo como se ve en la Figura 3. La actividad enzimática se realiza en células permeabilizadas según se explica en Materiales y Métodos y se expresa en las ordenadas en 10^{-19} moles de 4-metilumbelliferona liberada $\times \text{min}^{-1} \times \text{células}^{-1}$.

Después de los 25 minutos ocurre un aumento de la pendiente, describiendo una curva que tiende a formar meseta. Esto puede deberse a que el dimetilsulfóxido para actuar necesita cierto tiempo de incubación a partir de la cual aumenta la cantidad de sustrato que entra en contacto con la enzima celular. A pesar de que el comportamiento es semejante a un fenómeno de inducción esta posibilidad se descarta ya que el tiempo de la reacción no es suficiente para desencadenar un fenómeno inductor.

El efecto de la concentración del sustrato puede observarse en la Figura 4. En las abscisas se representa la concentración del sustrato 4-metilumbelliferil- β -D-glucurónico. En las ordenadas se representa

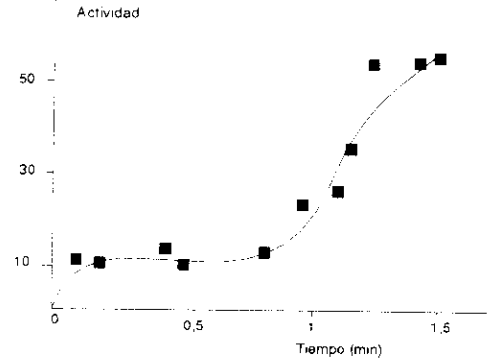


Fig 3. Efecto del tiempo sobre la actividad enzimática.

la velocidad expresada en cambio de intensidad fluorescente en 40 min. En la medida que aumenta la cantidad de sustrato, aumenta la intensidad fluorescente y por tanto la actividad enzimática, hasta un valor de saturación a partir del cual se mantiene constante.

TABLA I

Valores de fluorescencia obtenidos a partir de discos aplicando el método A modificado (*)

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
U.I. F.**	3.5	4	4.5	5.5	4.5	4.5	4.5	5.5	5.5	5.5

(*) Los resultados aparecen reportados con la sustracción del valor medio de los blancos ($x = 1,5$)

** Unidades de Intensidad Fluorescente

Durante el empleo del Método A modificado se obtuvieron los valores que aparecen en la Tabla II. Como puede observarse existe una diferencia manifiesta entre los valores del blanco y las determinaciones. El valor medio de la intensidad después de la corrección del blanco es de 4,75 con una desviación estándar de 0,72.

TABLA II

Resultados Obtenidos Con Cepas De *E. Coli* Aisladas De Pacientes

CEPAS DE <i>E. coli</i>	POSITIVOS	NEGATIVOS
Enteropatógenas	8	-
Típicas	40	5
Otras cepas	27	-
Total	75	5*

* Las 5 que no mostraron fluorescencia se interpretaron como cepas con bajos niveles de la enzima.

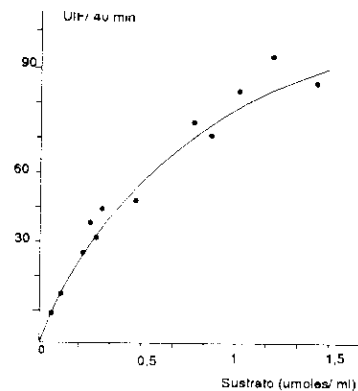


Fig 4. Efecto de la concentración celular sobre la actividad enzimática.

TABLA III

RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE CEPAS AISLADAS DE PACIENTES

Otras cepas	positivos negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	-2
<i>Citrobacter freundli</i>	-1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-1
<i>Serratia marcescens</i>	-1
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-1
<i>Micrococcus sp</i>	-1
<i>Pseudomonas sp.</i>	-11
<i>Salmonella sp.</i>	-1
<i>Staphilococcus coagulasa</i>	+1
Total	2

La constante de Michaelis (Km) por el Método de Hanes es de 0,078 mM y la velocidad máxima (V_{max}) es de 19,4 nm/min. En el caso de las cepas aisladas de pacientes que fueron sometidas a la determinación, no existieron FP, y solamente 5 cepas de *E. coli* no manifestaron actividad enzimática (ver Tabla II). Existió correspondencia por ambos métodos para 96 cepas de un total de 101 (ver Tablas II y III).

Con la cepa ATCC se ensayó 67 veces el Método B obteniéndose repetidamente fluorescencia con una intensidad de 3 cruces. La conservación de los discos fue buena durante 3 meses, o sea hubo ausencia de fluorescencia en todos los casos, lo que demostró su estabilidad a 4°C.

De igual forma se ensayó por incubando el microorganismo con los discos sobre la superficie del medio de cultivo durante toda la noche, así como colocando el disco 15 min sobre el crecimiento obtenido en placa después de incubación toda la noche. En ambos casos se obtuvo el mismo resultado (fluorescencia en presencia del microorganismo y ausencia de la misma en el control negativo).

Los valores de SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD obtenidos para el método B fueron los siguientes: S = 94 %, E = 100 %, así como los VALORES PREDICTIVO POSITIVO, Y PREDICTIVO NEGATIVO arrojaron porcentos de: VPP = 100 %, VPN = 81 %.

Los valores de sensibilidad y especificidad reportados en la bibliografía consultada para aquellos métodos de identificación de *E. coli* que se basan en la detección de esta enzima (la β -Glucuronidasa)

oscilan entre un 93 y 97 %^{34,16} y un 98 - 99 %², respectivamente, coincidiendo con los resultados alcanzados por nosotros.

De acuerdo a estos planteamientos podemos asegurar que el Método B brindó resultados confiables en un corto período de tiempo, (solo 15 min), con gran sencillez en su realización, y un bajo costo, 0,50 \$ por cada 200 determinaciones, brindando grandes perspectivas a su uso para el diagnóstico.

CONCLUSIONES

Analizando los resultados obtenidos, el nuevo método resultó lo suficientemente sensible y altamente específico para el total de muestras analizadas, o sea, demostró que los bacilos con adecuada morfología, que son β -Glucuronidasa positivos, pueden ser considerados como presuntas cepas de *E. coli* por tanto es recomendable para el diagnóstico lo que conllevaría a un mayor ahorro, eficiencia y rapidez en el laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Doller P.C., Helzmann W.R. and Werner H. J. *Microbiol. Meth.* 12, 51, 1990.
2. Helzmann W., Doller P. C., Gutbrod B. and Werner H. J. *Clin. Microbiol.* 26, (12), 2682, 1988.
3. Christopher J., Papasian G. Hertlein *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 255, 1987.
4. Kaspar C. W., Hartman P.A. and Benson A.K. *Appl. Env. Microbiol.* 53, (5), 1073, 1987.
5. Feng P.C.S. and Hartman P.A. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1320, 1982.
6. Killan M. and Bulow P. *Acta Pathol. Microbiol. Scand* 84, 245, 1976.
7. Al-Derzi N. and Mitchell J. *Clin. Pathol.* 41, 108, 1988.
8. Pérez J.L. y Berrocal C.I. *J. Appl. Bacteriol.* 61, 541, 1986.
9. Trepeta R.W. and Edberg S.C. *J. Clin. Microbiol.* 19, 172, 1984.
10. Adams M.R. et al. *Appl. Env. Microbiol.* 56, (7), 2021, 1990.
11. Lehninger A.L. En: *Bloquímica*. 2da. Edición. Editorial Pueblo y Educación. Cap. 8. 1981

SISTEMA DE INTRODUCCION CROMATOGRAFICA

Sistema automático para la producción cromatográfica de desorción térmica-crioconcentración directa (D.T.C. C. D.), diseñado en base a experiencias de laboratorio sobre procedimientos de introducción de sustancias extraídas y preconcentradas en polimeros porosos y por la técnica de desorción térmica controlada con el efecto de crioconcentración directa. El mismo es acoplable directamente a cualquier cromatógrafo de gases, permitiendo la introducción de microcantidades de muestras en columnas de relleno.

Producido y exportado por: CMC
 Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Av. 27 de Julio 765, Guaymas, P. V. C. U. La Habana, Cuba.
 Avanzada Pastelería S.A. 1990. Teléfono: 31 4000. Telex: 51 521 CMC CU.