

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO MULTIENZIMÁTICO PARA DETECTAR PRESENCIA DE BACTERIAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Lugo, T.¹; Glorio, A.¹; Franceschelli J.²; Marcipar, I.S.³; Morbidoni, H.R.² y Lagier, C.M.^{1}*

1. IQUIR, Unidad Analítica, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Rosario -2000-
2. Laboratorio de Microbiología Molecular, Cátedra Microbiología, Fac. Cs. Médicas, UNR., Rosario -2000-
3. LTI, Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL. Santa Fe -3000-

*e-mail: clagier@fbioyf.unr.edu.ar; lagier@iquir-conicet.gov.ar

Introducción

El estándar de oro para evaluar infección por microorganismos patógenos es la verificación de su presencia en la muestra biológica. No obstante, su visualización queda limitada al evento de muestras en que se encuentran en cantidad suficiente, o a su posterior identificación en cultivos realizados a partir de la muestra original. En este último caso, los tiempos de espera para la confirmación de la infección oscilan entre 48 hs y 60 días, dependiendo del tiempo de duplicación del patógeno en particular. Por ello, rutinariamente se utilizan métodos indirectos de bajo costo de diagnóstico de infecciones, comúnmente basados en la detección de anticuerpos específicos, por ejemplo, por medio de enzimo inmunoensayos, ELISA. Sin embargo, no siempre es útil esta estrategia por cuanto la presencia de anticuerpos puede deberse a infecciones pasadas o a procesos de inmunización programados como la vacunación. Es posible entonces apelar a métodos más onerosos, como la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, que permiten el diagnóstico de la infección por identificación de fragmentos específicos de ADN del patógeno, tras su amplificación. No obstante, estos métodos requieren de reactivos que pueden no ser amigables con el medio, además del elevado costo por determinación.

En este trabajo se presenta un método alternativo sencillo y económico que permite evidenciar la viabilidad o no de microorganismos, lo cual puede considerarse un indicativo indirecto de infección activa. Para ello, se propone evaluar por métodos espectrofotométricos multienzimáticos de alta sensibilidad el consumo de alguno de los nutrientes utilizados en medios de cultivo. No obstante, para lograr la especificidad respecto del microorganismo que consume el nutriente, es preciso recurrir a otras estrategias microbiológicas. Se han propuesto formatos en los que se utilizan virus que infectan específicamente al patógeno, denominados bacteriófagos o simplemente fagos, ocasionándole finalmente su lisis cuando liberan su progenie. En este trabajo, se lleva a cabo una prueba de concepto siguiendo un procedimiento similar al descrito para evaluar resistencia de microorganismos a drogas [1]. Para ello, en medios extremadamente complejos como un medio de cultivo conteniendo un microorganismo modelo, se procuró cuantificar la concentración remanente de nutrientes ante la

presencia y ausencia de un fago capaz de infectarle específicamente. En caso de verificarse la disminución de la concentración de tal nutriente, se inferirá que en la muestra sólo hay microorganismos viables. Siguiendo con el razonamiento planteado, la hipótesis de trabajo es que, a partir del inóculo de una muestra problema, si se verifica el consumo de nutriente ante la presencia del fago específico, significaría que no se ha ocasionado lisis de los microorganismos, lo cual estará indicando de modo indirecto, la ausencia del patógeno buscado que, de haber estado presente, debiera haber sufrido lisis y no podría haber consumido el nutriente.

Materiales y métodos

Se trabajó con microorganismos no infectivos modelo, como ser cepas de *Mycobacterium smegmatis* mc² 155, utilizando el bacteriófago D29 como elemento infectivo específico. Se realizaron incubaciones en paralelo de 3 tipos de suspensiones conteniendo: A) medio de cultivo con nutriente, con microorganismo y con fago lítico; B) medio de cultivo con nutriente, con microorganismo y sin fago lítico; C) medio de cultivo con nutriente, sin microorganismo ni fago lítico. Se utilizó un kit multienzimático comercial, actualmente utilizado en la determinación de triglicéridos, para cuantificar la fuente de energía de la que se nutre el microorganismo. Las lecturas de absorbancia del producto se efectuaron con un espectrofotómetro Beckman DU 640.

Resultados y discusión

Se realizaron las determinaciones analíticas pertinentes para cuantificar el nutriente. La curva de calibrado obtenida presentó linealidad en el rango 0,016 mM – 0,190 mM. En cuanto a cifras de mérito, la sensibilidad del método resultó ser 11,5 mM⁻¹, el límite de detección 5,2 µM y el límite de cuantificación 16 µM. Cuando se realizaron incubaciones del medio de cultivo adicionado del nutriente, con D29 y *M. smegmatis* mc² 155 (medio A), pudo verificarse que prácticamente no hubo disminución de concentración de analito, ya que los valores de concentración hallados no difirieron estadísticamente de los valores obtenidos al cuantificarlo en medios conteniendo sólo el aditamento del nutriente (medio C). Cuando se incubó el medio de cultivo adicionado de nutriente ante la presencia de mc² 155 (medio B), se pudo corroborar una disminución significativa en la concentración del analito, indicando que fue consumido por el microorganismo, el que en consecuencia era viable.

Conclusiones

Las pruebas de concepto efectuadas con microorganismos modelo, permitieron verificar la hipótesis planteada. Así, por medio de la cuantificación del nutriente tras la incubación del medio de cultivo con bacterias, se evidenció indirectamente su viabilidad. La disminución de la concentración de analito, estimada por un método espectrofotométrico de alta sensibilidad, coincidió con la incubación de bacterias no infectadas, mientras que cuando las bacterias fueron infectadas con un fago lítico, el nutriente se mantuvo en los mismos órdenes de concentración que el blanco.

Referencias

- [1] McNerney, R. *et al* (2004) *J. Clin. Microbiol.* 42, 2115–2120.