



Vol 16. N° 4
Octubre - Diciembre 2016

ISSN: 1317-2255 (IMPRESO)
Depósito Legal: pp 20002FA828
ISSN: 2477-9636 (ELECTRÓNICO)
Dep. legal ppi 201502ZU4642

Multiciencias

R M C_s

N F

Universidad del Zulia
Revista Arbitrada Multidisciplinaria



LUZ Punto Fijo

Núcleo LUZ-Punto Fijo
Programa de Investigación y Postgrado
Falcón-Venezuela

MULTICIENCIAS, Vol.16, N° 4, 2016 (375-378)
ISSN: 1317-2255 (IMPRESO) / Dep. Legal pp 20002FA828
ISSN: 2477-9636 (DIGITAL) Dep. Legal ppi 201502ZU4642

Prueba rápida modificada del ácido glutámico descarboxilasa para la identificación de *Escherichia coli* en aislados clínicos

Carla Lossada¹, Lenin González², Ricardo Silva¹.

¹ Unidad de investigaciones en microbiología ambiental (UIMA)-Sección bacteriología.

² Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias, LUZ. Maracaibo, Venezuela.

lossadacarla@gmail.com

Resumen

La prueba del ácido glutámico descarboxilasa fue desarrollada para la determinación de la presencia de *Escherichia coli* en muestras diversas. Se ha reportado que la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) es muy específica (97-99%) para la identificación de *Escherichia coli*, sin embargo no es una prueba de rutina. El objetivo de esta investigación consistió en la aplicación de la prueba rápida modificada del ácido glutámico descarboxilasa para la identificación de *Escherichia coli* en aislados clínicos. Se evaluaron aislamientos de diferentes muestras clínicas (*E. coli* BLEE 85 y *E. coli* BLEE 270) y cepas ATCC *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* ATCC®25923, *Enterococcus faecalis* ATCC®29212, *Staphylococcus aureus* ATCC®6538P, *Staphylococcus aureus* M03A-07, *Staphylococcus epidermidis* ATCC®12228 y *E. coli* ATCC®35218 arrojando una sensibilidad del 100%. Dicha prueba es ventajosa con respecto a otras pruebas convencionales, debido a su bajo costo, su rapidez en arrojar resultados, su alta sensibilidad, especificidad y exactitud del diagnóstico, lo que permite ahorro de personal, tiempo y de materiales empleados en la identificación.

Palabras clave: *Escherichia coli*; Ácido glutámico descarboxilasa; diagnóstico.

Rapid Modified Glutamic Acid Decarboxylase Test for the Identification of *Escherichia Coli* in Clinical Isolates.

Abstract

The test decarboxylase glutamic acid was developed for determining the presence of *Escherichia coli* in the medium. It has been reported that glutamate decarboxylase (GAD) is very specific (97-99 %) for identifying *Escherichia coli*, however it is not a routine test. The objective of this investigation is the application of the modified rapid test of glutamic acid decarboxylase for the identification of *Escherichia coli* in clinical isolates. Isolates from different clinical samples (*Escherichia coli* BLEE 85 and *Escherichia coli* BLEE 270) and ATCC strains were evaluated: *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC®25923, *Enterococcus faecalis* ATCC®29212, *Staphylococcus aureus* ATCC®6538P, *Staphylococcus aureus* M03A -07, *Staphylococcus epidermidis* ATCC®12228 and *E. coli* ATCC®35218. Giving a sensitivity of 100%. Such proof is advantageous over other conventional tests because of its low cost, its speed in giving results, high sensitivity, specificity and diagnostic accuracy, which allows saving staff time and materials used in identification.

Keywords: *Escherichia coli*; glutamic acid decarboxylase; diagnosis.

Introducción

Escherichia coli es un microorganismo patógeno que se encuentra con frecuencia en muestras obtenidas de aislados clínicos. Es el patógeno urinario más frecuente y ocupa de 60 a 80% de todos los aislamientos [4].

Desde hace mucho tiempo se han desarrollado métodos rápidos, sensibles y específicos para el diagnóstico de dicho microorganismo, los cuales en su mayoría son extremadamente costosos, es por ello que se hace necesario encontrar nuevas técnicas que además de poseer todas las características necesarias para la identificación del microorganismo, también sean lo suficientemente económicas y sencillas para que puedan ser incorporadas al diagnóstico clínico de rutina [2, 5, 6, 8, 9].

La enzima descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), cataliza la descarboxilación de ácido glutámico produciendo ácido aminobutírico y dióxido de carbono, y esta ha sido reportada anteriormente en *Escherichia coli* [2], presentando rangos de especificidad que varían de 97 a 99%.

Un método rápido para la detección de esta enzima, es el uso de una solución hipertónica de cloruro de sodio y Tritón X que se emplean como agentes líticos para la liberación de la enzima, y esto posibilita que la reacción ocurra en un período no mayor de 4h [10]. Aunque las ventajas de empleo de esta prueba han sido reportadas por varios autores, su uso en la rutina en los laboratorios

de microbiología diagnóstica no es común. La variante modificada, hace uso del Ácido dietilén diamín tetra acético (EDTA) el cual se utiliza como agente quelante de los iones de calcio, desestabilizando así la membrana externa bacteriana y facilitando la liberación del contenido citoplasmático [7].

Diversos autores reportaron respuestas positivas a la prueba rápida, obteniendo una sensibilidad diagnóstica para la identificación de *E. coli* de 100% en todos los tipos de muestras analizados. Aunque la especificidad diagnóstica resultó ser menor del 90% debido a la interferencia de cepas de *Shigella* en análisis de coprocultivos y la exactitud diagnóstica del método fue suficientemente alta ($92,62 \pm 2,97\%$) [9].

El objetivo de este trabajo consistió en la aplicación de la prueba rápida modificada del ácido glutámico descarboxilasa para la identificación de *Escherichia coli* en aislados clínicos.

Metodología

Se le aplicó la prueba rápida del GAD a las cepas de *E. coli*, obtenidas de aislados de muestras clínicas.

Prueba de Ácido Glutámico Descarboxilasa Modificado.

Se le realizaron algunas modificaciones para el preparado del reactivo GAD [7], generándose una matriz para la estandarización del reactivo, presentada en la tabla 1.

Tabla 1. Matriz para la estandarización del reactivo

Componentes	1	2	3
Ácido L-glutámico	0,1%	0,5%	1%
NaCl	9%	9%	9%
Verde de bromocresol	0,005 g	0,005 g	0,005 g
EDTA 0,001 M	200 µL	200 µL	200 µL

Datos en base a cada 100 mL de agua destilada con pH ajustado a 3,4. Una vez disueltos los componentes, las soluciones se esterilizaron en autoclave (sin el aminoácido) a 10lb por 15 min y posteriormente se añadió el ácido L-glutámico cerca del mechero. El reactivo preparado se almacenó en un frasco ámbar estéril en refrigeración, ya que de esta manera puede mantenerse por un período no mayor a dos meses.

Así mismo se variaron las concentraciones de reactivo-inóculo, generando de esta manera una matriz experimental de nueve posibilidades, cada formulación, numeradas como reacción 1, 2 y 3, se probó bajo las siguientes variaciones: a) una asada del microorganismo aislado a 0,2 mL de solución salina (0,9%) estéril, para lograr una suspensión microbiana equivalente al tubo 0,5 de la escala de MacFarland y se añadió 0,2 mL del reactivo estéril, b) una asada del microorganismo aislado de igual manera pero en 0,5 mL y se le añadió 0,2 mL del reactivo y c) Se aisló el microorganismo de la misma forma, en 0,2 mL y se añadió 0,5 mL del reactivo; generando de esta manera, una matriz experimental de nueve pruebas. Se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 h, observando los resultados cada 1 h. Un resultado positivo fue cualquier cambio del color del tubo de amarillo a verde o azul. La respuesta negativa corresponde al color amarillo (sin cambio).

Resultados y discusión

Con respecto al establecimiento del tiempo de incubación, se observó que la incubación de 2 horas permitió la identificación de los aislados de *Escherichia coli*. Los protocolos estudiados proponen un tiempo de incubación de 4 horas máximo. Se reportó que el 95% de las reacciones positivas se dieron a la hora de incubación y el total de reacciones a las 2 horas [9].

A las dos horas del período de incubación, se evidenció un cambio de color en la reacción 3b, (concentración 1% del aminoácido, 0,5 mL del inóculo y 0,2 mL del reactivo) de amarillo a verde. Al finalizar el plazo de cuatro horas, dicho diseño fue el único en presentar

cambio de color, mientras los restantes continuaron de color amarillo.

Las muestras restantes fueron tratadas con el reactivo y en cantidades que mostraron ser las más adecuadas, resultando positiva la prueba para *Escherichia coli* ATCC®35218, *E. coli* BLEE 270 y *E. coli* BLEE 85, evidenciando una elevada especificidad (100%) y sensibilidad (100%).

Modificando la prueba del GAD con EDTA, se obtuvo una sensibilidad de 100%, una especificidad de 100% y una exactitud de 100%, porcentajes similares fueron reportados en estudios donde se obtuvo una sensibilidad de 100%, una especificidad de 82,8% y una exactitud de 92%.

En este trabajo los elevados porcentajes se obtuvieron porque los aislamientos considerados provenían de urocultivos, mientras que en el estudio de Tsoravase y Muñoz, se consideraron muestras clínicas de coprocultivo, por lo que se manifestó la reacción positiva de especies de *Shigella*, afectando el porcentaje de especificidad [9]. En otro estudio [1] se reporta una sensibilidad de 96,87% para la prueba del GAD, debido a que dos aislamientos no mostraron actividad de esta enzima, así mismo en otra investigación se demostró una especificidad de 95% en aislamientos clínicos y ambientales [5].

Conclusiones.

La prueba rápida del GAD descrita por Tsoraeva y Muñoz [9] y la modificada, donde se cambió el Tritón X-100 por EDTA [7], resultan ser específicas para aislamientos de *E. coli*, lo cual genera resultados de identificación de esta bacteria en un mínimo de una hora (según lo reportado) y un máximo de 4 horas, acortando los tiempos de espera para el diagnóstico clínico debido a la alta sensibilidad (100%), especificidad (100%) y exactitud (100%) mostradas, por lo que el uso de esta prueba es altamente recomendable para el diagnóstico rápido y/o confirmación de *E. coli*.

De igual manera, se sugiere la aplicación de esta prueba modificada a una mayor cantidad de aislamientos para validarla.

Agradecimientos.

Los autores agradecen principalmente a la Universidad del Zulia (LUZ) por abrirle las puertas a los trabajos de investigación, en especial a los laboratorios que conforman la Unidad de investigaciones en

microbiología ambiental (UIMA) por prestar sus instalaciones, materiales y equipos.

Referencias Bibliográficas

- [1] CLERMONT, O; CHRISTENSON, J; DENAMUR, E; GORDON, D. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**, 5(1), 58-65.
- [2] DIEZ, F. (2004). A novel glutamate-dependent acid resistance among strains belonging to the Proteaceae tribe of Enterobacteriaceae. **FEMS microbiology letters**, 237(2), 303-309.
- [3] KARAGEORGOPOULOS, D; WANG, R; YU, X; FALAGAS, M. (2012). Fosfomicin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 67(2), 255-268.
- [4] KONEMAN, E; ALLEN, S; JANDA, W; SCHRECKENBERGER, P; WINN, W. (2004) **.Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color**. Editorial Médica Panamericana.
- [5] MISZCZYCHA, S; THÉVENOT, J; DENIS, S; CALLON, C; LIVRELLI, V; ALRIC, M; THEVENOT, D. (2014). Survival of *Escherichia coli* O26: H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157: H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. **International journal of food microbiology**, 172, 40-48.
- [6] ROJAS, N; CHÁVEZ, E; GARCÍA, F. (2008). **Bacteriología Diagnóstica**. Costa Rica, pp. 99-112.
- [7] SALINAS, I. (2012). Prueba del ácido glutámico descarboxilasa modificado para la rápida identificación de *Escherichia coli* aisladas en urocultivos, p. 40.
- [8] SCHMIEMANN, G; KNIEHL, E; GEBHARDT, K; MATEJCZYK, M; HUMMERS, E. (2010). InfectoNews–Jorge Omar Calabrese. **Dtsch Arztebl**, 107(21), 361-7.
- [9] TSORAEVA, A; MUÑOZ, J. (2005). Aplicación de la prueba rápida de glutamato descarboxilasa para la confirmación de *Escherichia coli* aisladas a partir de muestras clínicas **Revista Cubana de Medicina Tropical**, 57(3), 7.
- [10] WATERMAN, S; SMALL, P. (2003). The glutamate-dependent acid resistance system of *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* is inhibited in vitro by L-trans-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylic acid. **FEMS microbiology letters**, 224(1), 119-125.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

Multiciencias

Vol 16, N° 4

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada en diciembre de 2016, por el **Fondo Editorial Serbiluz**, Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve