

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE UN SUSTRATO CROMOGENICO CON PROMOTORES E INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN EL AISLAMIENTO, LA DIFERENCIACIÓN Y LA ENUMERACIÓN DE ENTEROCOCOS

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS (BIOCEN)¹

AUTORES PRINCIPALES: Marilyn Díaz Pérez¹, Claudio Rodríguez Martínez¹, Raisa Zhurbenko¹

OTROS AUTORES: Tamara Lobaina Rodríguez¹, Yanary Govín Raveiro¹

COLABORADORES DE BIOCEN:

Rachel Rábago Cápiro, Yuliet Elizabeth Pino González, Yaidelys Iglesias Torrens, Ivonne Alfonso Valdés, Diana Rosa Viera Oramas, Ana Luisa Cabrera González, Iraima de la Caridad Mezquida Rodríguez, Adelaida Ortega Suris, Yordania Zayas Ruiz, Dennis Someillan Iglesias, Ana Iris Brito González, Yudisleidy López Ricardo, Yoandry Abreut Torres, Maikel Villegas Blanco, Claudia Filgueiro Rego, Grisel Pérez Rodríguez, Ellenit González García, Marlery Sánchez Díaz, Alberto Eduardo Varela Llanes, Elisa Aznar García, Raúl González Hernández, Alexis Labrada Rosado, Yenela García Hernández, Julio César Portuondo Vázquez, Orestes Mayo Abad, Franklin Reinaldo Barroetabeña Márquez, Ana María Espronceda Amor, Mabel Alfonso Ruiz, Albertina Yris Estrada Rodríguez, Odalis Espinosa López, Vivian San Germán Rodríguez, Sara Quicute de Vera, Yoana Contreras Paez, Zamid Pérez Rodríguez, Isabel Rojas Gattorno, Anna Tsoraeva, Niurka Elvira Lara Vila.

COLABORADORES DE OTRAS INTITUCIONES:

Centro de Investigaciones Pesqueras

Raquel Silveira Coffigny, Mayelín Fuentes Bárcenas, Josefa Valladares

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Dianelys Quiñones Pérez

Hospital Pediátrico “Leonor Pérez”

Jorge Luis Muñoz del Campo

Hospital Pediátrico Docente “Juan Manuel Márquez”

Margarita Valdés Dapena, Julián Pérez Amarillo, Ernesto Hernández Robledo

Hospital General Docente “Enrique Cabrera”

Mairelys Rivero Rivero

Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas

Margot Martínez Arroyo, Olga Bello Rodríguez

Centro Nacional de Higiene y Epidemiología

Virginia Leyva Castillo, Giselle Pereda Lamela

AUTORA PARA LA CORRESPONDENCIA

Marilyn Díaz Pérez

Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN)

Carretera a Beltrán, km 1½, Bejucal, Provincia Mayabeque.

Teléfonos: (53-47) 68-28-85 **Fax:** (53-7) 8831144

Correo electrónico: marilyn.diaz@biocen.cu, diregral@biocen.cu

RESUMEN

Se estudió el efecto potenciador de diferentes composiciones de hidrolizados proteicos de origen animal y microbiano, obtenidos por métodos propios sobre el crecimiento de bacterias del género *Enterococcus* en combinación con una serie de inhibidores del crecimiento de bacterias pertenecientes a otros géneros. El diseño de los experimentos incluyó el estudio, por primera vez, del efecto de la combinación de dichas bases nutritivas con acetato de talio como inhibidor en presencia de dos concentraciones del sustrato cromogénico 6-cloro-3-indoxil- β -D-glucopiranosido, de otros marcadores para la detección de *Enterococcus* y sustancias como púrpura de bromocresol, xilosa, y fosfatos inorgánicos, sobre la recuperación, la identificación y la enumeración de especies de *Enterococcus* de interés clínico y sanitario. A partir de estos resultados, se desarrollaron dos nuevas composiciones que no contienen antibióticos ni sustancias carcinogénicas o teratogénicas, brindando protección al trabajador y al medio ambiente. Las nuevas formulaciones a pesar de ser altamente selectivas, logran suplir los complejos requerimientos nutricionales que poseen las especies de *Enterococcus*, favoreciendo su crecimiento en solo 24 horas. Los productos desarrollados fueron introducidos para su producción en serie en la planta de producción de Medios de Cultivo de BioCen según la norma ISO 9001:2008 y se registró en el CECMED la formulación destinada al diagnóstico clínico. Las composiciones desarrolladas, combinadas con la prueba rápida de L-pirrolidonil- β -naftilamida, permitieron definir un nuevo método para el diagnóstico de *Enterococcus*, en solo 24 h y con una exactitud de 96 % en muestras clínicas; y otro método para el análisis de estas bacterias en aguas por la técnica de filtración por membrana. Se estudiaron por primera vez diferentes parámetros de validación y de la incertidumbre de las

mediciones para estos microorganismos Grampositivos. Los estudios de validación demostraron que ambos métodos resultaron sensibles, específicos, exactos y equivalentes a los de referencia y se adecuan a las exigencias actuales del diagnóstico clínico y del análisis de aguas. Los nuevos métodos cromogénicos posibilitan la detección del género *Enterococcus* en menor tiempo que los métodos tradicionales, con elevado ahorro económico y fiabilidad. Son métodos sostenibles, consistentes y económicamente factibles. Los medios y métodos cromogénicos desarrollados se han introducido en varias industrias y laboratorios pertenecientes al Ministerio de la Industria Pesquera, en el Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHEM), así como en distintos centros hospitalarios del país. Ambos productos posibilitan la sustitución de importaciones y su aplicación contribuye a la detección temprana de estos peligrosos patógenos nosocomiales, al control de su resistencia antimicrobiana y a la vigilancia epidemiológica, además permiten la determinación de la calidad de las aguas de diferentes orígenes. Estos resultados forman parte de 1 tesis de doctorado, 1 de maestría, 2 tesis de grado y

10 artículos científicos de alcance nacional e internacional. Se presentaron en 14 eventos nacionales y en 11 eventos de carácter internacional. Parte de los resultados han sido reconocidos en un Premio a la Innovación Tecnológica a nivel nacional del CITMA (2015) y de un Premio a la Innovación Tecnológica del CITMA Provincial (Mayabeque) (2014); así como en trabajos destacados en el Fórum de Ciencia y Técnica a diferentes niveles, hasta obtener las categorías de Destacado y Relevante a nivel Provincial (Mayabeque).

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

Antecedentes: los enterococos son patógenos nosocomiales de especial relevancia a nivel mundial. Las opciones terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades que provocan son muy restringidas, siendo esencial lograr su detección temprana para prevenir la diseminación de estos microorganismos en el ambiente hospitalario y evitar el incremento de los niveles de resistencia. También es de vital importancia la búsqueda de estos gérmenes durante la ejecución de los procesos de control de calidad de las aguas, ya que son considerados indicadores de contaminación fecal. Las aguas pueden constituir un importante vehículo de su transmisión, si no son detectados a tiempo. El **objetivo** del presente trabajo fue obtener combinaciones de un sustrato cromogénico con sustancias nutritivas e inhibidores de microorganismos gramnegativos, sin el empleo de antibióticos, ni compuestos altamente tóxicos, ni teratogénicos y definir métodos de elevada exactitud para el aislamiento, la diferenciación y la enumeración de enterococos de interés en salud en un máximo de 24 h.

Resultados: se diseñaron dos novedosos medios de cultivo cromogénicos y sus respectivos métodos para el aislamiento, la diferenciación y la enumeración de enterococos en muestras clínicas y de aguas. En las composiciones desarrolladas se logró un adecuado balance de promotores e inhibidores del crecimiento microbiano, que favorece el crecimiento de las distintas especies de enterococos en

solo 24 h e inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Los medios de cultivo se desarrollaron a ciclo completo según los requisitos de las Buenas Prácticas de Laboratorio y Manufactura establecidas en BioCen. Ambos se introdujeron en la industria y se registró en el CECMED el diagnosticador que se destinada al análisis de muestras clínicas. Los nuevos métodos se derivan de la combinación de las composiciones desarrolladas con la prueba rápida de hidrólisis del L-pirrolidonil- β -naftilamida, y se destinan al aislamiento, la diferenciación y cuantificación de enterococos en muestras clínicas y de aguas de consumo, industriales y recreacionales, incluso aquellas tratadas y desinfectadas con cloro. Al evaluar la composición destinada a la clínica con 150 muestras (orina, sangre, fecales; exudados vaginales, exudados de lesiones de piel y de catéteres) se alcanzaron valores de los indicadores de calidad diagnóstico superiores a 95 %. Las especies de enterococos aisladas de estas muestras produjeron colonias rosadas en el medio de cultivo lo cual evidenció la hidrólisis del sustrato cromogénico producido por la acción de la enzima β -glucosidasa presente en este género. Se obtuvieron resultados en menor tiempo (24 h) que con los procedimientos tradicionales que se utilizan en los hospitales.¹

Se realizó un riguroso estudio comparativo del método desarrollado para la determinación de la calidad del agua por la técnica de filtración por membrana con el método establecido en la norma ISO 7899:2:2000 utilizado como referencia durante el estudio de 135 muestras de aguas de diferentes orígenes.^{2,3} Se ensayaron 44 y 42 cepas en los ensayos de inclusividad y exclusividad, respectivamente. Se comprobó la habilidad del nuevo método para detectar los microorganismos diana dentro de una variedad de microorganismos y de excluir posibles interferencias al estudiar un número significativo de microorganismos “no diana” grampositivos y gramnegativos. Se encontró una total coincidencia entre los valores de sensibilidad $98,1\pm 1,0\%$, especificidad 100% y exactitud $98,5\pm 1,0\%$ relativos para el total de las muestras de agua de forma presuntiva y confirmada. No se encontraron desviaciones positivas entre el método alternativo y el de referencia.

El valor del índice Kappa (0,96) demostró una concordancia “casi perfecta” entre los métodos. El límite de detección del método alternativo resultó suficientemente bajo (0,75 UFC/100 mL) y similar al del método de referencia (0,88 UFC/100 mL) lo cual garantizó la detección de enterococos incluso en las muestras de agua con bajo nivel de contaminación microbiana.

El análisis de regresión reflejó una adecuada exactitud relativa entre ambos métodos para todas las matrices de agua ensayadas. Se demostró la habilidad del medio cromogénico para recuperar las células microbianas diana incluso a partir de muestras de agua sometidas a procesos de tratamiento con cloro, debido a la ausencia de azida de sodio en la formulación. Los medios que se utilizan en el procedimiento estándar tienen incluido este agente selectivo en su composición y pueden inhibir parcialmente el crecimiento de los microorganismos diana sobre todo si proceden de muestras de aguas tratadas con cloro.

Ambos métodos tuvieron el mismo límite de cuantificación (10,33 UFC/100 mL). A través del cálculo del índice general de proporcionalidad se demostró que el método

desarrollado garantiza la fiabilidad de los recuentos en el intervalo de 20 a 80 UFC/placa que es intervalo de recuentos recomendado al utilizar la técnica de filtración por membrana.

Los métodos mostraron robustez en el intervalo de tiempo de 24 a 48 h de incubación y resultaron ser equivalentes en cuanto a los recuentos. Los estudios de repetibilidad y reproducibilidad demostraron que el método alternativo brinda las condiciones necesarias para la ejecución de recuentos por distintos analistas de manera confiable y que puede utilizarse de forma reiterada para el ensayo de múltiples muestras en diferentes laboratorios.

Conclusiones: las nuevas composiciones desarrolladas son altamente selectivas para el género *Enterococcus*, posibilitan el crecimiento de estos microorganismos en solo 24 h y su manipulación no representa daños para la salud ni el medioambiente. Los métodos desarrollados son procedimientos simples, rápidos resultan sostenibles, consistentes, económicamente factibles, su empleo en los laboratorios constituye una solución al diagnóstico clínico de enterococos y a la determinación de la calidad del agua en Cuba.

Novedad científica del resultado

Se obtuvo una original composición, sin referencias anteriores en la bibliografía científica o en la práctica comercial, para el diagnóstico de *Enterococcus* en la cual se combina un sustrato cromogénico con sustancias nutritivas obtenidas por métodos originales y un agente selectivo, sin la inclusión de antibióticos ni sustancias altamente carcinogénicas ni teratogénicas, que permite suplir los complejos requerimientos nutricionales de las especies de este género, y se desarrolló un nuevo método para su aislamiento, la diferenciación rápida y la enumeración en un máximo de 24 h, con valores de recuperación superiores al 95 %; se desarrolló una nueva composición cromogénica altamente nutritiva y selectiva, que forma parte de un nuevo método para el aislamiento, la diferenciación rápida y la enumeración del género *Enterococcus* por la técnica de filtración por membrana, en menor período de tiempo que el método estándar ISO7899-2:2000, en muestras de aguas de diferentes orígenes, incluyendo aquellas que son sometidas a los procesos de tratamiento y desinfección con cloro; se realizó la primera validación en Cuba de un método para el diagnóstico de bacterias grampositivas, aplicando una combinación creativa de diferentes guías y normas internacionales, que incluyó el estudio de un significativo número de parámetros cualitativos, cuantitativos y la determinación de la incertidumbre de las mediciones en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Los nuevos diagnosticadores y los métodos de ensayo son elementos de innovación en el campo de la Microbiología en nuestro país y se desarrollaron a ciclo completo según las buenas prácticas de laboratorio, manufactura y la norma ISO 9001:2008.

Importancia teórica del resultado

Las nuevas combinaciones cromogénicas de sustancias nutritivas, obtenidas por métodos peculiares, con el agente selectivo no teratogénico ni carcinogénico, brinda

nuevos aportes al conocimiento en el campo de la promoción del crecimiento de las diversas especies de *Enterococcus*, y de la inhibición de la microbiota acompañante presente en las diferentes muestras clínicas y de aguas, que por lo general han sido combinadas con inhibidores altamente teratogénicos y carcinogénicos como la azida de sodio.

Importancia práctica del resultado

Las composiciones cromogénicas y los métodos microbiológicos desarrollados tienen gran aplicación práctica en toda la red de hospitales, en los centros de higiene y epidemiología, así como en otras instituciones que se dedican al control de la calidad de las aguas para diferentes fines. Los nuevos diagnosticadores y métodos de ensayo posibilitan el aislamiento, la diferenciación y la enumeración de enterococos de interés en salud con elevada sensibilidad y eficacia, en un máximo de 24 h. La detección temprana de estos peligrosos patógenos resulta fundamental para el control de las enfermedades que provocan, para impedir su diseminación en el entorno nosocomial, establecer un sistema de vigilancia de la resistencia a antibióticos de varias generaciones y evitar la transmisión de enfermedades a través de los recursos hídricos. Los procedimientos desarrollados son sencillos, rápidos y con una demostrada eficacia, proporcionan una valiosa protección al hombre y al medioambiente y tienen una incidencia marcada en la elevación de los niveles de salud de la población y en la determinación de la calidad de las aguas de consumo, industriales y recreacionales, al poder establecer a tiempo las medidas oportunas de control sanitario. Posibilitan la sustitución de importaciones, acortan el tiempo de los ensayos al no ser necesarias pruebas bioquímicas adicionales, lo cual ahorra tiempo y recursos materiales y humanos. Además, por su elevado valor agregado, constituyen fuentes exportables.

Impacto social del resultado

Los resultados de la investigación tienen un impacto sobre la salud de los grupos de personas más vulnerables, las que se someten a terapias antimicrobianas frecuentes, al disponer de un nuevo método que posibilita el diagnóstico rápido de *Enterococcus* y la aplicación de una terapia oportuna y temprana; el empleo de los nuevos métodos puede prevenir la transmisión intrahospitalaria de *Enterococcus*, su reproducción en aguas de consumo y recreacionales, así como la transmisión y la ocurrencia de episodios graves provocados por este grupo importante de bacterias oportunistas.

Impacto económico del resultado

Los nuevos medios de cultivo cromogénicos desarrollados permiten la sustitución de importaciones de productos de similar propósito, su apropiada relación costo-beneficio hace factible su producción nacional en BioCen, constituyen fondos exportables, con precios tentativos para el mercado que son inferiores hasta en un 65 % a los de otros diagnosticadores que se comercializan en el extranjero para estos fines.

Los métodos resultantes reportan a los laboratorios un ahorro adicional de reactivos, materiales y recursos humanos, posibilitando una disminución significativa de los costos de los ensayos microbiológicos.

La aplicación de los nuevos métodos contribuye a la reducción de gastos y costos por concepto de una estadía prolongada de los enfermos en los hospitales, al posibilitar la detección temprana de *Enterococcus* y permitir la prescripción de una terapia antimicrobiana eficaz, lo cual repercute favorablemente en el control de la resistencia a los antibióticos y a la disminución de la morbilidad y mortalidad asociada con estos peligrosos patógenos.

Los nuevos medios de cultivo garantizan la protección de la salud de los trabajadores durante su manipulación y al mismo tiempo ofrece ventajas al medioambiente al no liberar al entorno desechos altamente tóxicos, ni con características carcinogénicas ni teratogénicas.

Los medios de cultivo y métodos cromogénicos desarrollados son sostenibles, consistentes y económicamente factibles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz Pérez M, Iglesias Torrens Y, Zhurbenko R, Quiñones Pérez D. Identificación de *Enterococcus* spp. procedentes de muestras clínicas con la utilización del medio cromogénico CromoCen[®] ENT. *Rev Cubana Med Trop* [online]. 2012, vol. 64, n. 2, pp. 142-152. ISSN 0375-0760.
2. Díaz Pérez M, Zhurbenko R, Fuentes Bárcenas M, Hernández Cortez C, Castro Escarpulli G, Rodríguez Martínez C. Evaluation of an alternative chromogenic method for the detection and enumeration of enterococci in waters. *Afr J Microbiol Res*, Vol 8 No. 7, 2014.
3. Díaz Pérez M, Zhurbenko R, Lobaina Rodríguez T, Quiñones Pérez D, Rodríguez Martínez C. Determinación cuantitativa de *Enterococcus* en aguas utilizando un método cromogénico alternativo. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2014; 33(1).