

Inhibición de la Reacción de Bioluminiscencia por Diferentes Extractantes del ATP Bacteriano

PILAR CONCHELLO^{1,2}, ELENA GRACIA¹, ANTONIO FERNANDEZ^{1,3} y BEATRIZ AMORENA¹

¹CSIC. Unidad de Sanidad Animal. SIA DGA. 50080 Zaragoza; ²dirección actual: Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. 50013 Zaragoza; ³dirección actual: Dpto. de Patología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. 50013 Zaragoza

INTRODUCCION. Hoy en día existe una gran necesidad de realizar determinaciones microbiológicas (detección y cuantificación de gérmenes) rápidas, sencillas, mediante técnicas de alta sensibilidad, fácil manejo y precio módico. Como método para estimar el número de células bacterianas, se ha utilizado la cuantificación del ATP bacteriano por bioluminiscencia. Este método se basa en que todas las células vivas tienen ATP y, tras extraerlo, el ATP reacciona en presencia del sistema enzimático luciferina-luciferasa, emitiéndose luz proporcionalmente a la concentración de ATP. Con el fin de obtener la máxima sensibilidad de la técnica, es preciso mantener las condiciones óptimas de reacción: presencia de O₂ y Mg²⁺, pH 7,75 y temperatura 22° C. La sensibilidad de la técnica de bioluminiscencia depende del tratamiento de la muestra; éste debería minimizar al máximo la inhibición de la reacción enzimática por alteración de las condiciones mencionadas o por inhibición directa de la reacción. Así, el tampón y el extractante utilizados deben ser comprobados para determinar el grado de inhibición que producen (Stanley et al., 1989). El objetivo de éste trabajo es evaluar el grado de inhibición enzimática de la reacción de bioluminiscencia, que ejercen diferentes compuestos utilizados como extractantes del ATP, con el fin de determinar para futuros estudios cuáles son los extractantes idóneos (que no inhiban la reacción).

MATERIAL Y METODOS. Según se indica en la Tabla 1, se han ensayado 4 extractantes diferentes en distintas proporciones muestra/extractante: ácido tricloroacético (TCA), lisostafina, dimetilsulfóxido (DMSO) y un preparado comercial (Releasing Reagent, RR, de Labsystems), constituido por una solución detergente de composición desconocida. Para determinar la posible inhibición de la reacción de bioluminiscencia por el extractante y el tampón, se utilizó como sustrato una cantidad conocida (4×10^{-11} moles) de ATP comercial (Labsystems), que se añadió al tampón y/o extractante en las mismas concentraciones y proporciones que las utilizadas por otros autores para el análisis de ATP bacteriano (Steijns et al., 1989). Se consideró que existía inhibición cuando la cantidad de luz obtenida (RLU)

al utilizar el extractante analizado era significativamente menor que la obtenida al utilizar en lugar del extractante un volumen equivalente de un tampón control (Tris pH 7,75 de Labsystems, carente de ATP). Los resultados se analizaron mediante el test estadístico de Dunnet de dos colas.

RESULTADOS Y DISCUSION. Cuando se utilizaron los extractantes TCA y lisostafina en todas las proporciones ensayadas, se observaron diferencias significativas en el grado de inhibición respecto del tampón control, con porcentajes de inhibición >90% y del orden del 80%, respectivamente (Tabla 1). Para ambos extractantes el grado de inhibición tendía a ser mayor cuanto mayor era la proporción de extractante utilizado, si bien no se demostró estadísticamente que dichas diferencias fueran significativas. Por el contrario, los extractantes RR y DMSO no inhibían la reacción de bioluminiscencia en las proporciones ensayadas, como se demuestra al comparar los resultados obtenidos respecto del control ($p > 0,05$). Por otra parte, cabe destacar la gran variabilidad en la respuesta (unidades relativas de luz, RLU) con el empleo de TCA y lisostafina ($CV > 50\%$) frente al RR y al DMSO ($CV < 19\%$), siendo la acción de estos dos últimos extractantes mucho más predecible (menor coeficiente de variación). Además, se ha comprobado que tras utilizar el DMSO como extractante de ATP bacteriano en estudios paralelos que se llevaron a cabo, la cantidad de luz emitida es prácticamente constante durante al menos 6 h (datos no ilustrados).

Tabla 1.- Efecto de diferentes extractantes en la cantidad de luz emitida^a por reacción enzimática de bioluminiscencia con ATP estándar ($10 \mu\text{l} = 4 \times 10^{-11}$ moles)

Extractante	Muestra/extractante	RLU \pm CV (n=5)	% Inhib. enzimática
TCA 2%	1/2	429,03 \pm 17,04	92,34 ***
TCA 2%	1/3	93,86 \pm 48,16	98,32 ***
TCA 2,5%	1/2	234,80 \pm 61,03	95,81 ***
TCA 2,5%	1/3	20,60 \pm 60,22	99,63 ***
Lisostafina	1/2,5	1382,56 \pm 55,17	75,33 ***
Lisostafina	1/5	593,16 \pm 74,64	89,41 **
RR	1/1	5125,60 \pm 18,14	8,52 NS
DMSO	1/1	4966,50 \pm 10,19	11,36 NS
DMSO	1/3	4877,40 \pm 9,87	12,95 NS
DMSO	1/9	4979,75 \pm 1,21	11,12 NS
Tampón Tris		4799,33 \pm 10,58	14,34 NS
Control		5603,00 \pm 8,34	0

^a Expresada en unidades relativas de luz (RLU).

En ésta tabla, las diferencias se evalúan con respecto al control: *** $P < 0,001$;

** $P < 0,01$; NS = No significativa

Al comparar los resultados obtenidos con los descritos por otros autores, se constata que el TCA ha sido propuesto como extractante eficaz a una concentración del 0,5% al 2,5% (p/v)

en la muestra por Lundin (1984) y Hussain et al. (1992) para diferentes microorganismos, entre ellos, los estafilococos coagulasa negativos, resaltando la necesidad de neutralizarlo en la muestra o eliminarlo después de la extracción debido a la inhibición que produce de la reacción de bioluminiscencia, posiblemente por modificación del pH. Este requisito determina una metodología más laboriosa. Igualmente, la lisostafina ha sido utilizada con buenos resultados por Tuncan y Martin (1987) a la concentración de 22 U/ml para la extracción del ATP de *S. aureus*. Sin embargo, en nuestro estudio se demuestra una inhibición de la reacción de bioluminiscencia que determinaría una menor sensibilidad en la estimación del recuento microbiano con respecto a la utilización del DMSO o del reactivo comercial RR. A pesar de ello, y dado que la lisostafina sólo presenta acción lítica sobre *S. aureus*, su empleo podría ser de gran utilidad para la la detección y cuantificación de éste microorganismo a partir de un cultivo o muestra que presente otras especies microbianas (Tuncan y Martin, 1987). Por último, cabe destacar que el DMSO ha sido evaluado positivamente como extractante por otros autores con respecto al TCA y otra solución detergente comercial de Lumac (Steijns, 1989).

En conclusión, el RR y el DMSO podrían considerarse por tanto buenos candidatos para su utilización como extractantes en futuros estudios, por la carencia de efectos inhibidores sobre la reacción de bioluminiscencia. No obstante, conviene tener en cuenta que el RR es caro y de composición desconocida, por lo que es difícil modificarlo y evaluarlo comparativamente.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por INIA, CONAI y FIS.

BIBLIOGRAFIA

- Hussain, M., Collins, C., Hastings, G.M., y P.J. White 1992 *J. Med. Microbiol.* 37:62-69.
- Lundin, A. 1984. En L.J. Kricka, P.E. Stanley, G.H.G. Thorpe, y T.P. Whitehead, "Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence", Orlando: Academic Press. London, p. 491-502.
- Tuncan, E.U. y S. E. Martin 1987 *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 88-91.
- Stanley, P.E., McCarthy, B.J. y R. Smither 1989 "ATP Luminiscence: rapid methods in microbiology". Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Steijns, J.M., Dirix, E. y H. Vanstaen 1989 En "ATP luminiscence: rapid methods in microbiology" Ed. P.E. Stanley et al. Blackwell Scientific Publications. Oxford, p. 183