Cuantificación de *Staphylococcus aureus* en Suspensión mediante ATP-Bioluminiscencia Utilizando DMSO y un Extractante Comercial

ELENA GRACIA[1], PILAR CONCHELLO[1,2], ANTONIO FERNANDEZ[1,3] y BEATRIZ AMORENA[1]

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

INTRODUCCION. La estimación de la viabilidad de bacterias en suspensión se realiza comúnmente mediante recuento en placa de unidades formadoras de colonias (ufc). Un método alternativo más rápido y objetivo es la ATP-bioluminiscencia. En él se utilizan idóneamente reactivos que no inhiban por si mismos la reacción de bioluminiscencia, extraigan eficazmente el ATP intracelular y permitan la estabilización de la emisión de luz. Según las observaciones de Conchello et al. (véase contribución correspondiente en estas Jornadas), el dimetil sulfóxido (DMSO) y un compuesto comercial (Releasing Reagent, RR de Labsystems) serían, en principio, buenos candidatos para ensayarlos como extractantes de ATP bacteriano, al no inhibir la reacción y ser estables (véase DMSO). El objetivo de éste trabajo ha sido evaluar la eficacia del método de ATP-bioluminiscencia (en relación al recuento directo de ufc) para estimación de la viabilidad de células de *Staphylococcus aureus* (cultivo puro en suspensión), utilizando DMSO y RR como extractantes del ATP.

MATERIAL Y METODOS. Se obtuvieron 10 ml de cultivos de *S. aureus* (aislados de mastitis clínicas bovinas) en TSB en fase estacionaria de crecimiento. Tras dos lavados de las bacterias con tampón Tris (pH 7,75), se ajustó la concentración a 4,6 $x10^9$ bacterias/ml de Tris, realizándose después diluciones seriadas. Para extraer el ATP, se utilizaron las proporciones muestra/extractante (v/v) de 1:1 y 1:9 para el DMSO y de 1:1 para el RR (recomendación de Labsystems). Se determinó el ATP en 40 μl de muestra/extractante con un luminómetro (Luminoskan RS 1.0 Labsystems) equipado con detector fotomultiplicador en el rango óptico 350-680 nm, por integración de la señal de luz (RLU) durante un periodo de tiempo preseleccionado (20 seg) y tras la inyección automática de 150 μl de tampón 0,1M Tris 1mM EDTA pH 7,75 (señal C_1), 25 μl del compuesto enzimático luciferina-luciferasa(señal C_2) y 10 μl (4x 10^{-12} moles) de ATP estándar (señal C_3) por este orden. La cantidad de ATP en la muestra se obtuvo de la expresión: ATP (fmol/40 μl) = (C_2-C_1/C_3-C_2) x 4 x 10^3 fmoles. Simultáneamente, se comprobó la viabilidad bacteriana de cada dilución, tras la extracción del ATP, por siembra de una alícuota de 100 μl sobre agar TSA (Cultimed).

RESULTADOS Y DISCUSION. Según se observa en la Tabla 1, a la concentración más baja estudiada ($8x10^5$ ufc/100 μl de suspensión muestra/extractante, o sea $1,6 x10^7$ ufc/ml de muestra en pureza), el DMSO en proporción 1:1 no extrajo todo el ATP bacteriano, puesto que tras la extracción se detectó crecimiento en placa. Igualmente ocurría con el RR en proporción 1:1 para concentraciones $>1 x10^7$ ufc/100 μl de muestra/extractante ($>2 x10^8$ ufc/ml de muestra en pureza), mientras que el DMSO en proporción 1:9 extraía exhaustivamente el ATP bacteriano a cualquiera de las concentraciones estudiadas, incluso a $\geq 2,3 x10^7$ ufc/100 μl de muestra/extractante ($\geq 2,3 x10^9$ ufc/ml de muestra en pureza).

Tabla 1.- *Eficacia de extracción del ATP según la luz producida en bioluminescencia (RLU) y el crecimiento bacteriano (ufc en agar) tras la utilización de diferentes extractantes*

Extractante	Muestra/ extractante	Extracción a distintas concentraciones bacterianas [a]							
		$8x10^5$		$7x10^6$		$1x10^7$		$2,3x10^7$	
		RLU	Crec.	RLU	Crec.	RLU	Crec.	RLU	Crec.
RR	1/1	1647	-	3567	-	3990	-	5767	+++
DMSO	1/9	1341	-	3742	-	3187	-	7497	-
DMSO	1/1	907	+	1931	+++				

[a] ufc/100 μl de muestra/extractante.

+ <30 ufc/100 μl; ++ 30-300 ufc/100 μl;+++ >300 ufc/100 μl; - Ausencia de crecimiento.

Dado que tanto el equipo como los reactivos influyen en la sensibilidad de la técnica, se determinó el límite de detección (en el ámbito de una respuesta lineal) obtenido con el equipo utilizado, mediante la realización de una curva estándar de calibración de ATP, utilizando concentraciones crecientes de ATP estándar desde $2x10^{-15}$ moles/ml, con DMSO y RR en una proporción ATP:extractante de 1:9 y 1:1, respectivamente. Ambos compuestos produjeron la misma señal (RLU) en el mismo rango de concentraciones de ATP (datos no ilustrados), estableciéndose el límite (inferior) de detección de ATP en $5x10^{-13}$ mol/ml de muestra/extractante con la utilización de DMSO (1:9) y $1x10^{-13}$ mol/ml de muestra/extractante con RR (1:1), resultado esperable, si esta diferencia se atribuye al efecto dilución de la muestra (1/1 y 1/9 para el RR y el DMSO, respectivamente), manteniéndose equivalente la eficacia de ambos extractantes al eliminar dicho efecto. La naturaleza inferior del límite teórico ($\sim 10^{-14}$ mol de ATP/ml) que establecen Schram et al. (1989) puede explicarse por el efecto que producen los reactivos utilizados.

Para predecir a partir de los datos de ATP los niveles de ufc/ml de un cultivo puro en medio líquido utilizando ambos extractantes, se consideró el límite de detección de ATP de la técnica establecido y se elaboraron las correspondientes curvas estándar (Fig. 1),

encontrándose una buena correlación lineal (r=0,99), entre la cantidad de ATP (fmol/ml) determinada por luminometría y el número de ufc/ml determinado por recuento en placa entre los siguientes límites: a partir de $3,46x10^5$ ufc/ml si se emplea DMSO (1:9) como extractante y de $6,9x10^4$ ufc/ml en el caso del RR en proporción 1:1 hasta $2,3x10^9$ ufc/ml y $2x10^8$ ufc/ml respectivamente, dependiendo de la capacidad de extracción del ATP de cada compuesto para estas concentraciones bacterianas. Con apirasa y sefarosa para eliminar el ATP contaminante de los reactivos, podría aumentarse la sensibilidad de la técnica para *S. aureus* (desde 25-50 ufc/ml hasta 10^4 ufc/ml, según Sala-Newby et al., 1989).

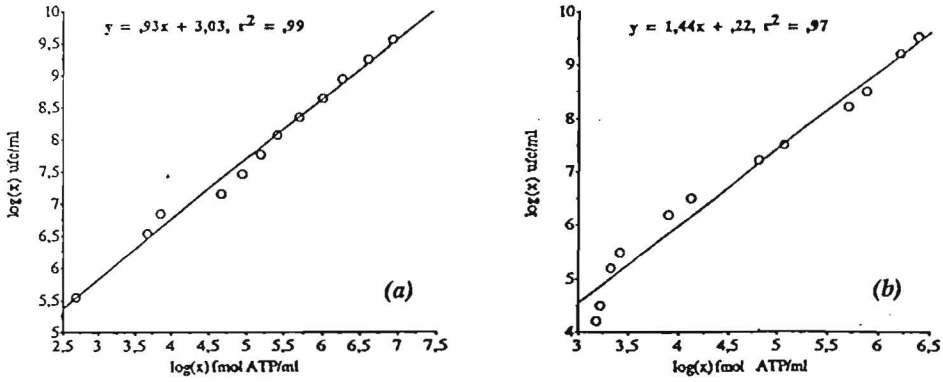


Fig. 1. *Correlación entre la cantidad de ATP (fmol/ml) determinada por luminometría y el número de ufc/ml según recuento en placa, utilizando DMSO (1/9)* **(a)** *y RR (1/1)* **(b).**

Para comprobar la eficacia de la mencionada recta en la predicción de ufc/ml a partir de la determinación del ATP bacteriano, se asoció el número de ufc/ml determinado por recuento en placa con el hallado por luminometría mediante la determinación del ATP según la expresión indicada en Material y Métodos, obsevándose una buena correlación (r=0,85; n=19), comparable a la obtenida en otras especies bacterianas (Littel y Larocco, 1985).

En conclusión, los extractantes implicados en este estudio (DMSO y RR) pueden considerarse eficaces para los rangos señalados de concentraciones bacterianas y con su aplicación pueden predecirse fielmente las concentraciones de células viables de *S. aureus* en suspensión.

AGRADECIMIENTOS. Financiado por INIA, CONAI y FIS.

Littel, K. J., K. Larocco. 1984. J. Food Protect. **48:** 1022-1024.
Sala-Newby, G.B., Goodfield, C., Johnson, I.R. et al. 1989. En "ATP luminiscence: rapid methods in microbiology" Ed. P.E. Stanley et al. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
Schram, E., Weyens-van Witzenburg, A.. 1989. En "ATP luminiscence: rapid methods in microbiology" Ed. P.E. Stanley et al (1989). Blackwell Scientific Publications. Oxford.