

CENTRO PROVINCIAL DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
GUANTANAMO

EVALUACION DE REACTIVO DE KOVAC MODIFICADO

Lic. Lourdes M. Expósito Boué¹, Téc. Ana Belkis Bott Crouble², Lic. Marlene Drullet Pérez², Lic. Yamilé Betancourt Arguello¹, Dra. Marina Sánchez Romero.³

RESUMEN

Se realiza un estudio en el laboratorio de Microbiología del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología (CPHEM) de Guantánamo, debido al insuficiente suministro de p-dimetilaminobenzaldehído, principio activo de los reactivos Kovac y Ehrlich, con el objetivo de diseñar una nueva fórmula que ofrezca la información de los reactivos de referencia. Se diseña el reactivo de Kovac modificado, reduciendo la cantidad de p-paradimetilaminobenzaldehído, de 10 a 2 g. Se realiza control de calidad y siembra concurrente de 200 cepas de enterobacterias en los medios Agua de Triptona y Motilidad-indol, realizando la lectura con el reactivo de Kovac normado y modificado. Los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo informan sobre la correspondencia de los resultados y se utilizan ambos reactivos. Se concluye que la fórmula modificada mantiene la calidad del diagnóstico y contribuye al ahorro del reactivo químico p-dimetilaminobenzaldehído.

Palabras clave: INDICADORES Y REACTIVOS; PROYECTOS DE DESARROLLO TECNOLÓGICO E INNOVACIÓN.

INTRODUCCION

Los reactivos de Kovac y Ehrlich son utilizados para la detección de la producción de indol por enterobacterias. Estos reactivos en pocas ocasiones son suministrados listos para su uso, por lo que es muy usual prepararlos a partir de sus ingredientes, constituyen el principio activo de ambos reactivos

¹ *Licenciada en Biología. Master en Enfermedades Infecciosas. Asistente.*

² *Técnico en Microbiología.*

³ *Master en Enfermedades Infecciosas. Especialista de I Grado en Microbiología.*

el p-dimetilaminobenzaldehído, el cual presenta inestabilidad en su suministro, y afecta la prestación de servicios a la población.

Las enterobacterias son clasificadas bioquímicamente en dependencia de la presencia o ausencia de determinadas enzimas que guían el metabolismo bacteriano por diversas vías; pueden ser detectadas a través de medios de cultivos, a los cuales se le incorpora el sustrato sobre el que actúan estas enzimas, junto con un sistema indicador que detecta la degradación del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos.

El reactivo de Kovac se utiliza como indicador de producción de indol que se forma por degradación metabólica del aminoácido triptófano. Esta prueba es importante para muchas especies de enterobacterias, siendo especialmente útil para diferenciar *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter*.¹⁻⁴

METODO

El estudio se realiza en el Laboratorio de Microbiología del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Guantánamo.

El universo de estudio está formado por cuatro lotes de reactivo de Kovac modificado, que es probado con 200 cepas de enterobacterias aisladas e identificadas de diferentes muestras clínicas.

Técnicas y procedimientos de laboratorio para la obtención del dato primario.

a) Análisis de la formulación de los reactivos a fusionar.

A continuación se exponen la composición de los reactivos de referencia y el análisis realizado para diseñar la nueva fórmula:

REACTIVO DE KOVAC		REACTIVO DE EHRLICH	
Composición	Cantidad	Composición	Cantidad
p-dimetilaminobenzaldehído	10.0 g	p-dimetilaminobenzaldehído	2.0 g
Alcohol amílico o isoamílico	150 ml	Alcohol etílico absoluto	190.0 ml
Acido clorhídrico concentrado	50.0 ml	Acido clorhídrico concentrado	40.0 ml
Volumen final	200.0 ml	Volumen final	230.0 ml
Concentración de p-dimetilaminobenzaldehído	5 %	Concentración de p-dimetilaminobenzaldehído	0.86 %

Al analizar los componentes de los reactivos, se tiene que el alcohol actúa como disolvente y extrae todo el indol contenido en el medio, el ácido clorhídrico concentrado actúa como catalizador de la reacción y el p-dimetilaminobenzaldehído es el principio activo de ambos reactivos y reacciona con el indol, formando un complejo rojo. En el caso del reactivo de Ehrlich, una vez que se adiciona al medio de cultivo para realizar la lectura, se debe agregar un ml de cloroformo.^{1,4}

Al analizar los reactivos que se disponían para confeccionar el Kovac y Ehrlich, se tuvo que no existía alcohol absoluto y cloroformo, por lo que es limitada la cantidad del producto químico p-dimetilaminobenzaldehído, por ende se comparan las fórmulas de los reactivos de referencia y se observa la concentración en que se encuentran ambas; se decide diseñar el reactivo de Kovac modificado y queda la fórmula como se muestra:

Reactivo de Kovac modificado

p-dimetilaminobenzaldehído	2.0 g
Alcohol amílico o isoamílico	150 ml
Ácido clorhídrico concentrado	50 ml

El volumen final obtenido es de 200 ml y la concentración de p-dimetilaminobenzaldehído es de 1 %, superior a la que se encuentra en el reactivo de Ehrlich, con lo que se logra alargar la vida útil del reactivo en existencia.

b) Inoculación, lectura e interpretación de los resultados.

Se inocula el medio Agua de Triptona o Motilidad-Indol con la bacteria en estudio, se incuba durante 18 a 24 horas a 37 °C. La lectura se realiza agregando unas gotas del reactivo de Kovac modificado. El cambio de color a rojo indica la presencia de indol.^{1,4}

c) Control de la calidad.

Una vez diseñado el nuevo reactivo, cada lote es sometido a ensayo para asegurarse de su aceptación y demostrar su actividad bacteriana, comprobando su capacidad de funcionar como indicador, utilizando las cepas normadas para el control biológico (*Escherichia coli* / *Klebsiella pneumoniae*) y estabilidad.^{1,5-7}

d) Siembra concurrente.

Una vez aislado el microorganismo y listo para su identificación, se realizó siembra de forma concurrente, utilizando los medios normados de referencia Agua de Triptona y Motilidad-Indol. Esta prueba se realizó con 200 cepas diferentes de enterobacterias aisladas en el laboratorio.

e) Técnicas de análisis estadístico^{8,9}

Las 200 cepas de enterobacterias se sembraron de forma concurrente en los medios Agua de Triptona y Motilidad-Indol, para comparar resultados y determinar:

- Confiabilidad o reproducibilidad: Mide nivel de concordancia entre pruebas repetidas.
- Validez (sensibilidad y especificidad) y rendimiento (valor predictivo positivo y negativo): Se utilizaron las fórmulas correspondientes para este fin y se confeccionó una hoja de cálculo, donde se introdujeron los valores de las categorías siguientes:

Verdaderos positivos: La prueba con el reactivo de referencia y el propuesto es positiva.

Verdaderos negativos: La prueba con el reactivo de referencia y el propuesto es negativa.

Falsos positivos: La prueba con el reactivo de referencia es negativa y con el propuesto es positiva.

Falsos negativos: La prueba con el reactivo de referencia es positiva y en el propuesto es negativa.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al comparar las fórmulas de los reactivos Kovac y Ehrlich, se diseñó una fórmula modificada de reactivo de Kovac utilizando los reactivos en existencia, reduciendo la concentración de p-dimetilaminobenzaldehído, del 5 al 1 %, la cual es superior a la encontrada en Ehrlich que es 0.86 %. Esto garantiza la cantidad suficiente del principio activo para actuar como indicador, al reaccionar el grupo aldehído de este compuesto con el indol, formando un complejo rojo. Esta formulación se llevó a la práctica para su comprobación.¹⁰

Al realizar el control de calidad a los diferentes lotes del reactivo de Kovac modificado, se obtuvo:

- El reactivo modificado tiene la capacidad de actuar como indicador, ya que los resultados de la lectura coincidieron con los resultados utilizando el Kovac de referencia: *Escherichia coli*: Indol positivo/ *Klebsiella pneumoniae*: Indol negativo.
- El reactivo es estable, ya que durante su conservación a temperatura ambiente y protegido de la luz, se repitieron las pruebas con periodicidad semanal, las que en todo momento tuvieron resultados satisfactorios.

Los resultados anteriores expresan que el reactivo modificado pasó la prueba satisfactoriamente.

EVALUACION DEL REACTIVO DE KOVAC MODIFICADO

1. Confiabilidad o reproducibilidad: La formulación modificada resultó reproducible porque existió concordancia de los resultados obtenidos en los diferentes lotes confeccionados.
2. Validez y rendimiento: Al determinar los verdaderos positivos y negativos, producto del uso concurrente del reactivo de referencia y el modificado, se encontró correspondencia total de los resultados

utilizando el reactivo de Kovac de referencia y el modificado, no existiendo falsos positivos y negativos, es decir, todos los lotes mostraron con una misma cepa la misma reacción. Se obtuvieron 96 cepas indol positivo (verdaderos positivos) y 104 indol negativo (verdaderos negativos), utilizando los medios Agua de Triptona y Motilidad-Indol. No se identificaron falsos positivos y falsos negativos. La sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo del reactivo modificado con relación al de referencia fue del 100 %.

En la revisión bibliográfica realizada no se encuentran trabajos similares a este, solo se registran las fórmulas anteriormente expuestas de los reactivos de Kovac y Ehrlich.^{1-4,10-12}

Esta nueva formulación es económica ya que por cada 200 ml de reactivo confeccionado se ahorran 8 g de p-dimetilaminobenzaldehído, manteniendo la calidad del diagnóstico. Ha sido utilizada desde el año 2000 en el Laboratorio de Microbiología del CPHEM Guantánamo.

CONCLUSIONES

Se logró diseñar, implementar y evaluar el reactivo de Kovac modificado, obteniéndose valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo que informan sobre la correspondencia de los resultados utilizando el reactivo normado y el modificado, lo que habla sobre la calidad del nuevo medio diagnóstico para ser usado en la identificación bioquímica de las enterobacterias.

El control de calidad y los resultados de la siembra concurrente de 200 cepas de enterobacterias para determinar la presencia de indol, utilizando el reactivo normado y el modificado, confirman la seguridad de su uso en el diagnóstico.

No se ha encontrado informes de estudios semejantes.

RECOMENDACIONES

Es una formulación sencilla, práctica y económica ya que ahorra p-dimetilaminobenzaldehído, ofrece idénticos resultados que las formulaciones normadas, por lo que se recomienda su uso.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Koneman E, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. Diagnóstico microbiológico. México: Editorial Médica Panamericana; 1989.
2. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Manual de Medios de Cultivo. 2ªed. La Habana: Centro Nacional de Biopreparados BioCen; 2001.
3. microbelibrary.org[página web en Internet]. Jonson M. Prueba de Indol. 2002 ene[citado: 22 oct 2009]. Disponible en: <http://www.microbelibrary.org/Laboratory%20Diagnostics/details.asp?id=454&Lang=Spanish>
4. Fichasdeseguridad.com[página web en Internet]. Reactivo de Kovac. [citado: 28 oct 2009] Disponible en: http://www.fichasdeseguridad.com/datos_seguridad.php?q=Reactivo%20de%20Kovacs
5. Norma Ramal. Control de Calidad de los Medios de Cultivo utilizados en el Diagnóstico Microbiológico. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 1990.
6. Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorios en Bacteriología Clínica. Ginebra: OMS; 1993.
7. Weng Alemán Z, Iglesias Fernández B, Abreu Orta M, Beltrán Díaz JR. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencias[serie en Internet]. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2004 [citado: 28 oct 2009]; 42(1). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol42_1_04/hie04104.htm
8. Baryarre H, Hersford R. Metodología de la Investigación. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2004.
9. Baryarre H, Hersford R, Oliva M. Estadística descriptiva y estadística de salud. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2005.
10. Wikipedia.org[página web en Internet]. Prueba del indol. 2008 Oct [citado: 22 oct 2009]. Disponible en: http://www.es.wikipedia.org/wiki/Prueba_del_indol.
11. Comprante.gob[página web en Internet]. Medio de cultivo preparado, medio movilidad indol ornitina (mio) para aislar salmonella. [citado: 2 Abr 2009]. Disponible en: web.compranet.gob.mx:8000/.../C2DetaLic.detalle?
12. Salud.gob.mx[página web en Internet]. Norma oficial mexicana nom-114-ssa1-1994, bienes y servicios. método para la determinación de salmonella en alimentos. [citado: 28 oct 2009]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html>

TABLA 1. RESULTADO DE LA SIEMBRA CONCURRENTE CON UTILIZACIÓN DE REACTIVO DE KOVAC DE REFERENCIA Y MODIFICADO.

MICROORGANISMO	AGUA DE TRIPTONA		MOTILIDAD - INDOL		TOTAL
	KR + KM +	KR - KM -	KR + KR +	KR - KM -	
Escherichia coli	46	-	46	-	46
Enterobacter	8	18	8	18	26
Klebsiella	28	15	28	15	43
Proteus	12	21	12	21	33
Citrobacter	-	17	-	17	17
Salmonella	-	23	-	23	23
Shigella	2	10	2	10	12
TOTAL	96	104	96	104	200

*Leyenda: KR: reactivo de Kovac normado
 KM: reactivo de Kovac modificado
 +: positivo, -: negativo*