

# LA $\beta$ -GLUCOSIDASA. NUEVO MARCADOR BIOQUIMICO PARA LA DIFERENCIACION DE LA TRIBU KLEBSIELLAE

A. Niebla Perez y C. Pascual Marqu

Departamento de Diagnostico Bioquimico y Microbiologico, Centro Nacional de Investigaciones Cientificas, Ciudad de la Habana, Cuba.

**RESUMEN.** Se evaluó la actividad de la  $\beta$ -fucosidasa,  $\beta$ -arabinosidasa,  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucuronidasa en cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, y *Serratia sp*, frente a una batería de sustratos fluorescentes derivados de la metilumbelliferona, detectándose alta actividad de la enzima  $\beta$ -Glucosidasa en los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*. La  $\beta$ -glucosidasa resultó de gran importancia para la identificación de los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* cuando se combinó con la detección cualitativa de la enzima ornitina-descarboxilasa, al permitir la clasificación en solo 3 h 30 min. También se detectó actividad  $\beta$ -xilosidasa en *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Escherichia coli* y actividad  $\beta$ -glucuronidasa en *Escherichia coli*.

**ABSTRACT.** The activity of  $\beta$ -fucosidase,  $\beta$ -arabinosidase,  $\beta$ -xilosidase,  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase was evaluated in strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, and *Serratia sp*, employing a set of fluorescent substrates derived from methylumbelliferone. A high  $\beta$ -glucosidase activity was detected in *Klebsiella* and *Enterobacter* genus. The  $\beta$ -glucosidase activity resulted to be important for the identification of *Klebsiella* and *Enterobacter* genus when the fluorogenic test was combined with the detection of ornitine-decarboxylase activity, which is possible in just 3 h and 30 min. A  $\beta$ -xilosidase activity was also found in *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* and *Escherichia coli*, as well as  $\beta$ -glucuronidase activity in *Escherichia coli*.

## INTRODUCCION

La identificación de bacterias está basada en pruebas de caracterización. Usualmente, los resultados correspondientes a las pruebas convencionales y aislamientos clínicos no están disponibles en menos de 48 h.<sup>1-3</sup> Una reducción significativa de este tiempo se obtendría con sistemas capaces de brindar estos resultados a partir de una simple colonia tomada de aislamiento primario en placa y que necesitan no más de 3 h para completarse. La ventaja de estos sistemas consiste en que requieren pruebas enzimáticas independientes del crecimiento.<sup>2-4</sup>

La particularidad de que las enzimas puedan actuar sobre más de un sustrato, permite el uso de compuestos artificiales para la determinación de la actividad enzimática a condición de que la afinidad de la enzima hacia éstos sea similar a la que presente por el sustrato natural.<sup>3</sup> Estos sustratos, generalmente cromogénicos o fluorescentes, han permitido el desarrollo de una nueva tendencia dentro del diagnóstico microbiológico: la identificación de especies microbianas empleando marcadores enzimáticos en un período muy corto de tiempo.<sup>2,3,7-23</sup>

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la actividad de las enzimas  $\beta$ -fucosidasa,  $\beta$ -arabinosidasa,  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucuronidasa con una batería de sustratos derivados de la metilumbelliferona, buscando un posible nuevo marcador bioquímico para la diferenciación de los géneros *Escherichia sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* y *Serratia sp* dada la importancia del diagnóstico rápido de estos microorganismos.

## MATERIALES Y METODOS

Cepas patrones empleadas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, *Enterobacter aerogenes* ATCC 23355, *Serratia marcescens* ATCC 8100.

Cepas provenientes de aislamientos clínicos: *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*. Sustratos empleados (Koch-Light):

- 4-metilumbelliferil- $\beta$ -L-fucopiranosido
- 4-metilumbelliferil-L-arabinopiranosido
- 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-xilopiranosido
- 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucopiranosido
- 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronido

Se prepararon en soluciones a una concentración de 1,5 mmol/L en PBS (pH 7,2) empleando dimetilsulfóxido como agente permeabilizante (10 mL/200 L).

**Método De Detección De La Enzima Empleando Los Sustratos Fluorogénos**

Este método se basa en la reacción de la enzima celular con el sustrato específico, que al ser hidrolizado libera el compuesto 4-metilumbelliferona que fluoresce bajo la luz UV a pH > 7.

### Procedimiento

Cien microlitros de un cultivo de 24 h crecido en caldo lactosado fueron centrifugados a 12'000<sup>r</sup>/min durante 2 min y el sedimento celular se resuspendió en 200 L de la solución del sustrato en cuestión. Se incubó a 37°C en baño durante 30 min. La reacción se detuvo con la adición de 800 L de solución amortiguadora de Carbonato de Sodio (pH 10,7, 0,5<sup>m</sup>ol/L).

Las lecturas se realizaron en un fluorímetro Corning-Eil-244, ajustado previamente con un patrón de sulfato de quinina.

## METODO DE DETECCION DE LA ENZIMA EMPLEANDO DISCOS

Discos de papel de filtro Whatman No.3 de un diámetro de 5 mm se embebieron en las soluciones preparadas a partir de los sustratos fluorescentes. Posteriormente fueron extraídos, secados en cámara de sílica-gel y conservados en frascos ámbar.

### Procedimiento

Los discos de papel se colocaron sobre un soporte plástico y se les añadieron 10 L de agua destilada. Posteriormente se colocó sobre los discos una asada del microorganismo a probar, se incubó 30 min a 37°C, se añadieron 10 L de NaOH 0,1 mol/L y se observó bajo una lámpara de luz UV (A 409 P. W. Allen and Company) a una longitud de onda de 366 nm.

### Determinación Cualitativa De Ornitina-descarboxilasa<sup>24,25</sup>

Con el objetivo de diferenciar a los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* se realizó la prueba de la ornitina-Descarboxilasa por el método original de Moller, empleándose el mismo medio propuesto por este autor, el cual se distribuyó a razón de 5 mL por tubo y se inoculó con asadas provenientes de cultivos de 24 h, crecidos en cuñas de agar nutritivo. Los tubos se recubrieron con 1 mL de parafina líquida estéril y se incubaron a 37°C. Las determinaciones se realizaron a las 24 h. Un cambio de color hacia el amarillo en la mezcla de los indicadores presentes en el medio se interpretó como ornitina-descarboxilasa negativa mientras que un cambio de color hacia el violeta oscuro, como ornitina-descarboxilasa positiva.

### Determinación Cualitativa De Ornitina-descarboxilasa. Método Modificado

Este método tiene como fundamento el mismo principio del método empleado en la determinación anterior, pero al realizarse a partir

de un cultivo ya crecido la respuesta del ensayo enzimático se obtiene en un periodo de tiempo más corto.

La solución para inducción de ornitina-descarboxilasa a partir de suspensión celular (SIO) se preparó de la siguiente forma:

ornitina	piridoxal	glucosa	pH
0,01 g/m	0,000 5 g/mL	0,000 5g/mL	6

Mezcla de indicadores empleados (MI): púrpura de bromocresol al 0,04 % y rojo-fenol al 0,2 % en proporción 16:1.

#### Procedimiento

Se centrifugaron 400 L de un cultivo de 6 h crecido en caldo nutriente, a 12 000 r/min durante 2 min y se resuspendieron en igual volumen de agua destilada, se añadieron 800 L de la solución SIO, 20 L de la mezcla MI y 5 L de NaOH 0,02 mol/L. Se añadió parafina estéril y se incubó 3 h en baño a 37°C, observándose el cambio de color al cabo de este tiempo.

El cambio de color en la suspensión fue interpretado como se describió anteriormente. Los resultados se compararon con los obtenidos por el método de Moller.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla I muestra las actividades obtenidas a partir de la batería de sustratos fluorógenos empleando cepas patrones y cepas provenientes de aislamientos clínicos. En el caso de las cepas patrones se hizo una prueba de visualización en discos de papel para aquellas enzimas que mostraron actividad (Tabla II).

**Tabla I**

Actividad enzimática detectada en cepas patrones empleando sustratos derivados de la 4-metilumbelliferona

ENZ	Klebsiella sp		Serratia sp		Enterobacter sp		E. coli	
	st	ais	st	ais	s	ais	s	ais
F	nd	0,0330	nd	nd	0,0004	0,0002	nd	nd
A	0,0032	0,0069	0,0004	nd	0,0009	0,0261	nd	0,0013
X	0,0027	0,0247	nd	nd	0,0009	0,0980	nd	0,0462
G	0,0946	0,0994	0,0022	nd	0,0615	0,2085	nd	0,0032
Gl	nd	nd	nd	nd	nd	0,0187	0,0064	0,0389

La actividad enzimática está expresada en nmo/min.  
nd: no detectado st: cepas patrones ais: cepas provenientes

ENZ:enzimas F:  $\beta$ L-fucosidasa A: L-Arabinosidasa  
X:  $\beta$ L-Xilosidasa G:  $\beta$ L-Glucosidasa Gl:  $\beta$ L-Glucuronidasa

Para las enzimas  $\beta$ L-fucosidasa y L-arabinosidasa se obtuvieron valores de actividad muy bajos o prácticamente nulos.

La enzima  $\beta$ -xilosidasa dió cierta actividad en *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes*. Esta actividad enzimática ha sido reportada para estos géneros<sup>22</sup> e incluso en *E. coli* puede aparecer también. Los valores bajos pueden deberse a la diferencia de valores de Km de la enzima por el sustrato, pues esta actividad está reportada<sup>22</sup> para el o-nitrofenil- $\beta$ D-xilopiranosido, derivado del o-nitrofenol, mientras que las determinaciones realizadas en el presente trabajo se hicieron con un derivado de la metilumbelliferona.

Se detectó también actividad  $\beta$ -glucuronidasa en *E. coli* y *Enterobacter sp*. En este último caso, sólo para la cepa proveniente de aislamiento clínico y en *E. coli* tanto para la cepa patron como la de aislamiento clínico. Esta enzima está reportada en *E. coli* con alto valor para su diagnóstico, con una sensibilidad del 95%<sup>3,10,20,22,23</sup>. La  $\beta$ -glucuronidasa puede aparecer también en *Shigella* (40%) y en algunos serotipos de *Salmonella*<sup>23</sup> (30%). También se conoce la presen-

cia de  $\beta$ -glucuronidasa en *Enterobacter*<sup>20</sup>, pero con muy baja incidencia.

**Tabla II**

Detección cualitativa de la actividad enzimática en las cepas patrones por visualización directa bajo una lámpara de luz UV, empleando discos de papel

ENZIMAS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>E. coli</i>
$\beta$ L-Fucosidasa	nd	nd	nd	nd
L-Arabinosidasa	nd	nd	nd	nd
nd $\beta$ L-Xilosidasa	nd	nd	nd	nd
nd $\beta$ L-Glucosidasa	+	nd	+	nd
nd $\beta$ L-Glucuronidasa	nd	nd	nd	+

nd: fluorescencia no detectada  
++: intensa fluorescencia

Los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* tanto en las cepas patrones como en los aislamientos clínicos dieron actividad positiva por ambos métodos y de manera ostensible para la enzima  $\beta$ -glucosidasa que por la magnitud de su actividad fue posible detectarla visualmente en papel.

La ornitina-descarboxilasa resultó positiva para *Enterobacter aerogenes* y negativa para *Klebsiella pneumoniae* por el método de Moller a las 24 h (Tabla III). Por el método modificado se obtuvo igual resultado en un intervalo de 3 h.

**Tabla III**

Resultados de la prueba de detección cualitativa de la ornitina descarboxilasa en cepas patrones, empleando los métodos de Moller y Moller modificado.

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Serratia marcescens</i>		<i>Enterobacter aerogenes</i>		<i>E. coli</i>	
	M	MM	M	MM	M	MM	M	MM
COLO	amarillo	amarillo	violeta	violeta	violeta	violeta	violeta	violeta
resultado	-	-	+	+	+	+	+	+

(-) ornitina-descarboxilasa negativa M: Moller  
(+) ornitina-descarboxilasa positiva M M: Moller modificado

Teniendo en cuenta que el género *Enterobacter* se caracteriza por ser ornitina-descarboxilasa positivo, salvo *Enterobacter agglomerans* y que el género *Klebsiella* es ornitina-descarboxilasa negativo, pudiera emplearse como método para la clasificación de los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* la prueba de detección de la  $\beta$ -glucosidasa en un primer tamizaje, cuyo resultado puede visualizarse bajo una lámpara de luz UV en un periodo de 15 a 30 min a partir del cultivo primario. Las cepas positivas pueden someterse a la prueba de la ornitina-descarboxilasa bien por el método tradicional o utilizando la modificación descrita en este trabajo.

## CONCLUSIONES

Se observó actividad  $\beta$ -xilosidasa en los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*. Además, se detectó actividad  $\beta$ -glucuronidasa en *E. coli*, enzima con gran valor para su diagnóstico, así como altos niveles de  $\beta$ -glucosidasa en los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* cuya detección en combinación con el ensayo cualitativo de la ornitina descarboxilasa permite diferenciar ambos géneros.

Esta metodología de caracterización solo permite llegar hasta género, pero reporta grandes ventajas debido a la rapidez con que se identifica el género y el ahorro de medios de cultivos que implica, por lo que potencialmente la detección de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en combinación con otra prueba complementaria, como lo es la ornitina descarboxilasa, permitiría un diagnóstico rápido del agente infeccioso dentro de las 24 h en caso de que fuera un patógeno de la tribu Klebsiellae.

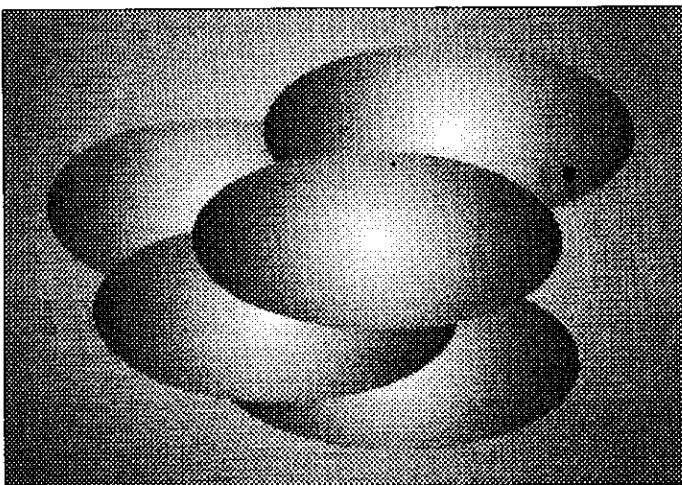
Sería recomendable continuar los estudios de la  $\beta$ -glucosidasa en los géneros de mayor interés en Clínica con el objetivo de conocer datos exactos de su sensibilidad y especificidad dadas las perspectivas que ofrece.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bascomb S. In: **Proc. European Symp on New Horizons in Microbiology**. Rome A. Sanna and G. Morace, eds. 241-250. Elsevier, Amsterdam, 1984.
2. Bascomb S. In: **Proc. 4th Int. Symp. on Rapids Methods and Automation in Microbiology and Immunology**. Berlin. K. O. Habermahl, eds. 367-376. Springer-Verlag, Berlin, 1985.
3. Bascomb S. In: **Methods In Microbiology. Enzyme tests In Bacterial Identification. Vol 19**. ISBN 0-12-521519-3. Acad. Press. Limited, 105-160, 1987.
4. Kersters K and De Ley J. In: **Methods In Microbiology, vol 6A**, J.R. Norris and D.W. Ribbons eds. Academic Press, London, 1971.
5. Bascomb S. In: **Microbiological Classification and Identification**, M. Goodfellow and R.G. Board, eds. Academic Press. New York, 359-373, 1980.
6. Bascomb S. **Inserm**. 114, 471, 1983.
7. Barth M.G.M. and Bridge P.D. **Letters In Applied Microbiology** 9, 177, 1989.
8. Adams M.R., Grubb S.M., Hamer A. and Clifford M.N. **Applied Environ. Microbiol.** 56, 2021, 1990.
9. Bhowmik T. and Marth E. H. **Applied Environ. Microbiol.** 55, 3240, 1989.
10. Papasian J.F. and Hertlein G. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 8, 255, 1987.
11. Heizmann W., Doller P.C., Gutbrod B. and Werner H. J. **Clin. Microbiol.** 26, 2682, 1988.
12. Kaufold A., Luticken R. and Schwien U. **Zbl. Bakt.** 272, 191, 1989.
13. Dalton M.T., Haldane D. and Mac Donald J. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** 12, 521, 1990.
14. Perry J.L., Miller G. and Carr D. **J. Clin. Microbiol.** 28, 614, 1990.
15. Gerber M.A., R-Facklam R., Randolph M., DeMeo K. **Pediatrics** 86, 457, 1990.
16. Thompson J.S., Hodge D. and Borczyk A. **J. Clin. Microbiol.** 28, 2165, 1990.
17. Geary C. and Stevens M. **Med. Lab. Sci.** 46, 291, 1989.
18. Miyamoto T., Miwa H. and Hatano Sh. **Appl. Environ. Microbiol.** 56, 1480, 1990.
19. Pompei R., Comaglia G., Inglianni A. and Satta G. **J. Clin. Microbiol.** 28, 1214, 1990.
20. Perez J.L., Pulido A., Gomez E., Sauca G. y Martin R. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 9, 421, 1990.
21. Smitka C.M. and Jakson G. **J. Clin. Microbiol.** 27, 203, 1989.
22. Al-Derzi N. and Mitchell N.G. **J. Clin. Pathol.** 41, 108, 1988.
23. Feng C.S. Peter, and Hartman P.A. **Applied and Environ. Microbiol.** 43, 1320, 1982.
24. Moller V. **Acta Path. Microbiol.** 36, 158, 1955.
25. Harrigan W.F. and McCance M.E. In: **Metodos de Laboratorio en Microbiologia**, Editorial Academia León. España, 247, 1961.

# RAPI-DISC

Discos Fluorescentes para el diagnósticos ultrarápido de *Echerichia coli*



- Mediante el empleo de Discos fluorescentes impregnados con el sustrato 4 metilumbelliferil bD-Glucurónido se hace posible en solo 15 minutos la detección de *Echerichia coli*, microorganismo de más alta incidencia (60-80 %) en las infecciones del tracto urinario.
- Alta confiabilidad
- Bajo costo
- Elevada especificidad (97,6 %)
- Altamente sensible (97,1 %)
- Solo requiere una lámpara de luz UV

Producido y exportado por: CNIC

Centro Nacional de Investigaciones Científicas.  
Ave. 25 y calle 58, Cubanacán, Playa, C. de La Habana, Cuba.  
Apartados Postales 6880 y 6990  
Teléfono: 21 8066 / Teléx: 51 1582 CNIC CU