

Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*

Alejandro Echeverría, Ana Gabriela Durante, Alicia Arechavala y Ricardo Negroni

Unidad Micología, Hospital Muñiz, Buenos Aires, Argentina

Resumen

Según lo publicado en trabajos anteriores, existiría una relación entre la producción y liberación de enzimas con actividad fosfolipasa y la patogenicidad de agentes infecciosos como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*. Con el objeto de comparar la sensibilidad de los medios agar malta yema de huevo (MEA) y agar Sabouraud yema de huevo (SEA), empleados en la detección de fosfolipasa, se estudiaron 54 cepas de *C. albicans* y 44 cepas de *C. neoformans* obtenidas de diversas muestras clínicas de origen humano. Se realizó la medición de los diámetros correspondientes a las colonias y a los halos de hidrólisis de fosfolípidos, se determinó el cociente entre ambos y se consideró a este valor como un indicador de la producción de enzima. Dichos cocientes variaron entre 0 y 1, correspondiendo los niveles máximos de producción enzimática a aquellos valores más próximos a cero. El estudio nos permitió observar que la actividad enzimática se detectó en 34 cepas de *C. neoformans*. En 20 (59 %) de ellas, se observó sólo en agar Sabouraud, cinco cepas (15 %) mostraron actividad fosfolipasa sólo en agar malta y finalmente en un 26 % (nueve cepas) pudo detectarse en ambos medios en forma simultánea. De las 42 cepas de *C. albicans* en las que se detectó actividad fosfolipasa, 31 (73,8 %) presentaron halo en MEA solamente y 10 (23,8 %) únicamente en SEA. Una sola cepa mostró actividad enzimática en ambos medios. También se evaluó el tiempo de incubación necesario para una mejor medición de los halos; para ello se estudiaron 41 cepas de las 54 cepas de *C. albicans*, realizando lecturas a las 24, 48 y 72 h. Finalmente se observó, que mientras a las 24 h no se detectaba expresión de la enzima, a las 48 h 15 cepas aún no mostraban halos y recién a las 72 h se observó hidrólisis en 34 cepas, considerando este resultado como definitivo. Se podría concluir que aunque ninguno de los dos medios resultó óptimo, cuando se analiza la actividad de fosfolipasa en *C. neoformans*, la mayor sensibilidad se obtiene al emplear el medio base Sabouraud suplementado con yema de huevo. El tiempo de incubación necesario para la detección de la actividad enzimática en *C. neoformans* es de seis días, sin que se pueda observar ninguna ventaja en prolongar la incubación más allá de este tiempo. Inversamente cuando la producción de enzima se estudia en cepas de *C. albicans* se logra mayor sensibilidad al emplear el medio agar malta yema de huevo, siendo el tiempo óptimo de incubación para la lectura 72 h.

Palabras clave

Actividad fosfolipasa, Virulencia, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

Dirección para correspondencia:

Dr. Ricardo Negroni
Juncal 3475 - 4^o "C"
1425 Buenos Aires
ARGENTINA
Tel.: +54 11 4822 8150
Fax: +54 11 4822 8150
E-mail: ricardox@janssen.com.ar

Aceptado para publicación el 6 de Mayo de 2002

Comparative study of two culture media for the detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* strains

Summary

Phospholipase activity (PHA) is considered a virulence factor related to pathogenicity of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*.

The aim of this work was to compare the ability of two culture media: malt egg-yolk agar (MEA) and Sabouraud-egg yolk agar (SEA), for the detection of phospholipase activity. Forty four strains of *C. neoformans* and 54 of *C. albicans* isolated from different clinical specimens of human origin were studied.

The phospholipase production was determined as a ratio between the diameter of each colony and the corresponding lysis halo. The values ranged between 0 and 1, and the highest level of enzymatic activity was the nearest to 0.

Enzymatic activity was observed in 34 *C. neoformans* strains, grown either in MEA or SEA media; 59 % of enzyme producers were detected in SEA only, while five strains (15 % of producers) were detected just in MEA medium.

Phospholipase activity was observed in both media only in nine of 34 enzyme producer strains.

Forty two out of 54 strains of *C. albicans* were detected as enzyme producers; 31 of them (73.8 %) were detected in MEA medium only. On the other hand 10 strains (23.8 % of the enzyme producers) showed phospholipase activity just in SEA medium. Detection of PHA could be done by both media in one case only. In order to evaluate the time needed to detect PHA, 41 *C. albicans* strains were incubated 72 h. They were read at 24 h intervals. No enzyme activity was detected at 24 h, 15 enzyme producer strains remain negative at 48 h and the halos of all strains with PHA were better distinguished after 72 h.

It was possible to conclude that neither MEA nor SEA media were good enough as the unique medium to detect phospholipase activity. Nevertheless, MEA was better than SEA to detect PHA of *C. albicans* after 72 h incubation.

The opposite situation was seen when we studied PHA in *C. neoformans* strains. In this case, greater sensibility was observed with SEA medium compared with MEA medium. Six days incubation, but not longer incubation times, were necessary to detect phospholipase activity in *C. neoformans* strains.

Key words

Phospholipase activity, Virulence, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

En numerosos trabajos se han descrito los diversos factores de virulencia de los que disponen agentes infecciosos como *Candida albicans* [1-3] y *Cryptococcus neoformans* [1,4-6]. También se han publicado experiencias que demuestran el importante papel que desempeñan algunos de estos factores, como las enzimas con actividad de fosfolipasa, en la patogénesis de las infecciones por ellos producidas.

Estas enzimas tienen la capacidad de dañar la membrana celular de las células del huésped, al degradar los lípidos que la constituyen. La producción o no de estas enzimas puede, entonces, ser un importante determinante en la capacidad de los microorganismos para producir infecciones invasoras en determinados grupos de pacientes, como los inmunocomprometidos.

Distintos autores han diseñado y publicado diferentes metodologías para detectar la producción y liberación de fosfolipasas en hongos tales como *C. albicans* y *C. neoformans* [4-5,7-8]. Con el objetivo de determinar la utilidad de dos medios para medir esta actividad enzimática, realizamos un estudio comparativo entre los medios agar Sabouraud yema de huevo y agar malta yema de huevo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. Se trabajó con 44 cepas de *C. neoformans* y 54 cepas de *C. albicans* (Tabla 1), aisladas a partir de distintas muestras clínicas obtenidas en la Unidad Micología del Hospital de Enfermedades Infecciosas "Francisco J. Muñiz", Buenos Aires, Argentina.

Identificación. Se arribó a la tipificación final de *C. albicans*, por el cultivo de las cepas en el medio CHROMagar y la observación de la producción tubos germinativos y clamidosporos en un medio con leche y Tween 80 [10]. Las cepas de *C. neoformans* fueron identificadas por la observación directa de la cápsula en tinta china, producción de fenoloxidasas en medio agar semillas de girasol y la positividad de la prueba de ureasa rápida [9-10].

Detección de la actividad fosfolipasa. Las cepas aisladas fueron sembradas en medio de Sabouraud sin antibiótico e incubadas a 37°C durante 18 h. A partir de estos cultivos se prepararon los inóculos de trabajo en solución fisiológica [7]. El inóculo final fue aquel que correspondió a una densidad óptica de 0,075 de absorbancia a una longitud de onda de 590 nm. Mediante el empleo de un multiinoculador se sembraron 2 µl de estas suspensiones en agar malta yema de huevo -MEA- (Agar malta 65g; NaCl 1M, CaCl₂ 0,005 M; yema de huevo estéril 2 %; agua destilada 1000 ml) y en agar Sabouraud yema de huevo -SEA- (Agar glucosado de Sabouraud 65 g; NaCl 58,45 g; CaCl₂ 0,0554 g; yema de huevo estéril 80 ml; agua destilada 1000 ml). La incubación se realizó a 37 °C durante 72 h para *C. albicans* y durante 10 días para *C. neoformans*. La lectura para las cepas 1 a 41 de *C. albicans*, se hizo a las 24, 48 y 72 h de incubación. En todos los casos restantes se realizó solamente a las 72 h. Con las cepas de *C. neoformans* la lectura se realizó a los 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días. Empleando un calibre se midieron los diámetros de las colonias así como los diámetros de zonas de hidrólisis y se calcularon los índices de actividad enzi-

mática (Pz) como la relación entre estos valores [7]. Este índice permite tener una idea del nivel de actividad de fosfolipasa para cada cepa. El mismo puede tomar valores que van de 0 a 1, correspondiendo aquellos más próximos a 0 a niveles máximos de actividad enzimática. Inversamente, aquellos índices con valores próximos 1 fueron indicativos de un bajo nivel en dicha actividad. En cepas que no mostraron actividad fosfolipasa el índice Pz fue igual a 1.

Cálculo de la sensibilidad de los medios. La sensibilidad del ensayo para cada medio se calculó como el cociente entre el número de cepas con actividad fosfolipasa detectadas en un medio particular sobre el número total de cepas con actividad enzimática detectadas en cualquiera de los dos medios.

RESULTADOS

Los resultados de este estudio comparativo se muestran en las tablas 1 y 2.

Treinta y cuatro cepas de *C. neoformans* mostraron actividad de fosfolipasa en alguno de estos dos medios. Un 59 % de ellas (20 cepas) lo hicieron solamente en medio SEA, en tanto que sólo cinco cepas (15 %) evidenciaron actividad enzimática únicamente en MEA, los nueve aislamientos restantes presentaron halos simultáneamente en ambos medios de cultivo.

El tiempo óptimo de incubación antes de realizar la lectura de las placas fue de cinco o seis días. Sólo luego de este tiempo de incubación se detectó la totalidad de cepas con actividad enzimática. Ninguna cepa categorizada como no productora luego de cinco o seis días de incubación, se detectó como productora de la enzima al prolongar el tiempo de incubación.

Cuarenta y dos de las cepas de *C. albicans*, presentaron actividad fosfolipasa en alguno de los dos medios. En 32 ocasiones (76,2 % de las cepas que mostraron actividad enzimática), la detección fue posible en el medio MEA, mientras que en 11 cepas (26,2 % de esos 42 aislamientos), la actividad enzimática pudo ser determinada en SEA. Solamente una cepa presentó actividad enzimática en ambos medios simultáneamente (Tabla 2).

Puede apreciarse claramente que el número de cepas en las que se detectó actividad enzimática (índice de producción < 1), fue mayor cuando el cultivo se realizó en el medio MEA. Por el contrario la mayoría de las *C. albicans* cultivadas en medio SEA se comportaron como no productoras de enzima, mostrando un índice de producción igual a 1. En cuanto a *C. neoformans*, se observó el fenómeno inverso ya que el mayor porcentaje de cepas que presentó actividad enzimática lo hizo en SEA.

La importancia del tiempo de incubación para evidenciar la actividad enzimática en *C. albicans* puede apreciarse claramente en la figura 1. En 41 cepas se estudió el efecto de esta variable. La actividad fosfolipasa no pudo ser detectada en ninguna de estas 41 cepas, en ninguno de los dos medios analizados a las 24 h; a las 48 h se comprobó actividad enzimática en 19 cepas (15 en MEA y cuatro en SEA) y a las 72 h pudo comprobarse esta actividad en 34 cepas (25 en MEA y 9 en SEA). A partir de los resultados obtenidos con estas 41 cepas, se decidió efectuar la lectura de los restantes 13 aislamientos de *C. albicans* solamente a las 72 h.

En *C. neoformans*, la actividad de fosfolipasa se evidenció entre los cinco y seis días. No hemos podido observar ninguna ventaja en prolongar el tiempo de incubación más allá de los seis días, ya que no se detectó ninguna cepa de *C. neoformans* que mostrara esa actividad a partir de ese lapso.

Tabla 1. Detección de la producción de fosfolipasa en cepas de *C. neoformans*, empleando agar malta yema de huevo y agar Sabouraud yema de huevo.

Índice de producción	Número de cepas	
	Agar malta yema de huevo	Agar Sabouraud yema de huevo
1	30	15
0,90-0,99	1	2
0,80-0,89	1	7
0,70-0,79	6	11
0,60-0,69	2	7
0,50-0,59	2	1
0,40-0,49	2	1
0,30-0,39	0	0
0,20-0,29	0	0
0-0,19	0	0

Tabla 2. Detección de la producción de fosfolipasa en cepas de *C. albicans*, empleando agar malta yema de huevo y agar Sabouraud yema de huevo.

Índice de actividad enzimática	Número de cepas	
	Agar malta yema de huevo	Agar Sabouraud yema de huevo
1	22	43
0,90-0,99	1	1
0,80-0,89	2	1
0,70-0,79	1	2
0,60-0,69	7	2
0,50-0,59	9	0
0,40-0,49	7	2
0,30-0,39	5	3
0,20-0,29	0	0
0-0,19	0	0

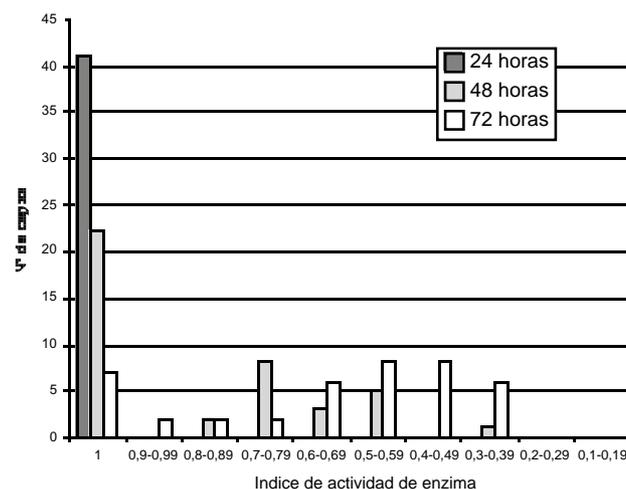


Figura 1. Importancia del tiempo de incubación para detectar la producción de fosfolipasa por parte de cepas de *C. albicans*.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La capacidad de producir y excretar enzimas con actividad fosfolipásica de ciertos hongos patógenos, ha sido considerada por varios autores como un potencial factor de virulencia y patogenicidad [1-5]. Se ha postulado, que las fosfolipasas tendrían un papel importante en la capacidad de dichos microorganismos para producir infecciones invasoras [2-6].

El objetivo de este estudio fue evaluar la utilidad de dos medios base diferentes adicionados con yema de huevo, para evidenciar la producción y liberación de estas enzimas, en cultivos de *C. albicans* y *C. neoformans*, así como establecer la aplicabilidad clínica de esta prueba dado que todas las cepas incluidas en este trabajo fueron aisladas de pacientes con infecciones activas.

En este estudio no pudimos ratificar los resultados obtenidos por Vidotto y col. [4] en cepas de *C. neoformans*. Este autor empleó el medio MEA y fue capaz de detectar 78 % de las cepas con alto nivel de actividad fosfolipasa (índice de producción < 0,69), en tanto que en este estudio utilizando dos medios de cultivo, sólo fuimos capaces de comprobar ese nivel de actividad enzimática en seis cepas en MEA y en nueve en SEA; las razones de estas diferencias no las conocemos.

Las cepas ensayadas mostraron tener, más frecuentemente, niveles bajos y moderados de producción, (índices de producción entre 0,70-0,79 y 0,80-0,89, respectivamente). En este caso, el medio SEA también resultó ser más sensible para detectar estas cepas (65,9 % de las 44 cepas analizadas). En nuestra población de *C. neoformans*, el porcentaje de cepas no productoras fue sensiblemente mayor que el encontrado por Vidotto en su trabajo.

A partir de los resultados obtenidos en nuestra experiencia podemos concluir que la utilización del medio base Sabouraud, aún como única alternativa permitiría detectar el 85 % de las cepas de *C. neoformans* con capacidad de producir y liberar enzimas de actividad fosfolipasa. Por el contrario si sólo se empleara el medio base

malta, para esta finalidad, la sensibilidad estaría muy por debajo de lo aceptable. En nuestra experiencia sólo se detectaron 14 cepas (41% de las cepas productoras) con este medio base.

El tiempo óptimo de incubación para *C. neoformans* sería de seis días. Tiempos de incubación más prolongados no incrementarían el número de cepas detectadas como productoras.

De las 54 *C. albicans* estudiadas, la producción de fosfolipasas se detectó en 42. En 31 ocasiones la detección se llevó a cabo sólo en el medio MEA, en diez casos únicamente en agar SEA y en solamente una cepa mostró actividad enzimática en ambos medios.

Para el cálculo de las sensibilidades de los dos medios se consideró como referencia a todo resultado positivo en cualquiera de los dos medios individualmente o por ambos de forma simultánea (34 cepas de *C. neoformans* y 42 cepas de *C. albicans*, respectivamente). Comparando con estos números de positivos, las sensibilidades calculadas fueron 41,2% para el agar MEA y 85,3% para el agar SEA, cuando se estudiaron cepas de *C. neoformans* y 76,2% para el MEA y 26,2% para el agar SEA para el estudio de *C. albicans*.

A pesar de la capacidad marcadamente superior del medio base agar malta para la detección de fosfolipasas en *C. albicans*, ninguno de los dos medios mostró suficiente sensibilidad. De ningún modo, podría aceptarse como definitivo, un resultado negativo obtenido por cualquiera de las dos metodologías. Nuestra conclusión, es que al menos dos métodos deben ser empleados para asegurar un resultado negativo. Si esta situación no fuera aceptable desde el punto de vista coste-beneficio, el uso de MEA parecería ser la mejor opción.

Con respecto al tiempo de incubación, acorde a los resultados antes mencionados, concluimos que, para *C. albicans* ningún resultado antes de las 72 h puede ser considerado como definitivo.

Agradecemos a la Dra. Rocío Alonso Vargas, de la Universidad del País Vasco, quien nos enseñó la metodología de detección de fosfolipasas en medio de Sabouraud-yema de huevo.

Bibliografía

- Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 1217-1221.
- Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 63: 1993-1998.
- McLain N, Dolan JW. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microbiology* 1997; 143: 3521-3526.
- Vidotto V, Sinicco A, Di Fraia D, Cardaropoli S, Aoki S, Ito-Kuwa S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1996; 136: 119-123.
- Chen S, Muller M, Zhou Z, Wright L, Sorrell T. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J Infect Dis* 1997; 175: 414-420.
- Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 Years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 515-548.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 7-14.
- Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses* 1992; 35: 9-16.
- Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 1982; 150: 1212-1220.
- Negróni R, Guelfand L. Manual de procedimientos para laboratorios de Micología Médica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 1999, Suplemento, 1ª Ed. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.