



Artículo original

Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp.

María Mercedes Panizo*, Vera Reviákina, Yamilán Flores, Williams Montes, Gladys González

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Ministerio de Salud
Caracas - Venezuela

Recibido 23 de septiembre de 2005; aceptado 18 de octubre de 2005

Resumen: El objetivo de este trabajo fue determinar y comparar la actividad de fosfolipasas y proteasas de cepas de *Candida* spp., así como correlacionar la actividad enzimática con el sitio de aislamiento de las levaduras. Se emplearon 95 cepas de *Candida* spp. aisladas de diferentes muestras clínicas. La actividad de fosfolipasas se evaluó de acuerdo al ensayo de Polak, utilizando dos medios de cultivo a base de yema de huevo. La actividad de proteasas se evaluó según el ensayo de Aoki y col., utilizando un medio de cultivo a base de albúmina sérica bovina. Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas de ANOVA y *t* de Student para muestras pareadas. Se pudo establecer que las cepas de *Candida albicans* poseen más actividad de proteasas que las especies de *Candida* no *albicans*, así como una relación entre la actividad de proteasas y el sitio de aislamiento de las levaduras. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al evaluar la actividad de fosfolipasas entre *Candida albicans* y *Candida* no *albicans* y no se pudo establecer una relación entre la actividad de fosfolipasas y el sitio de aislamiento de las levaduras. Los medios de cultivo sólidos son una alternativa viable y fácil de usar para evaluar la actividad enzimática de proteasas y fosfolipasas en un laboratorio de micología, unido a pruebas de rutina como el examen directo y el cultivo, para la identificación de especies de *Candida*. Su uso puede tener una gran aplicabilidad, ayudando a establecer si existe una relación entre la producción de estas enzimas y la patogenicidad de estas levaduras, asociado al sitio de aislamiento de las mismas.

Palabras Clave: Fosfolipasas, proteasas, *Candida* spp., medios de cultivo

Phospholipase and protease activity in clinical *Candida* spp. isolates

Abstract: The objectives of this work were to determine and to compare the phospholipase and protease activity of *Candida* spp. strains, and to correlate the enzymatic activity with the place of yeasts isolation. 95 *Candida* spp. strains isolated of different clinical samples were used. Phospholipase activity was performed according to Polak, using two egg yolk agar culture media. Protease activity was assayed according to Aoki et al., using bovine serum albumin agar plates. For the statistical analysis ANOVA test and paired samples Student's *t* test were used. It could be settled down that *Candida albicans* strains possess more protease activity than *Candida* non *albicans* species, as well as a relationship between protease activity and yeasts isolation place. No statistically significant differences were obtained when *Candida albicans* and *Candida* non *albicans* phospholipase activity were evaluated and could not settled down a relationship between the phospholipase activity and yeasts isolation place. Solid culture media are a viable and easy-to-use alternative, to evaluate protease and phospholipase enzymatic activity in a mycology laboratory, for the identification of *Candida* species, together with routine tests like direct exam and culture, and would help to establish if a relationship exists between yeasts pathogenicity and enzymes production, associated with the isolation place of the same ones.

Keywords: Phospholipase, protease, *Candida* spp., culture media

* Correspondencia:
E-mail: merceval@cantv.net

Introducción

Debido al incremento en la incidencia de las infecciones causadas por levaduras del género *Candida*, hay un gran interés en la investigación de sus factores de virulencia,

con la finalidad de establecer una relación entre estos factores y la patogenicidad, diseñar estrategias de control y prevención de la candidosis, así como desarrollar nuevos agentes terapéuticos con estos factores como posibles blancos de acción [1,2].

Candida albicans es un patógeno ampliamente reconocido, pero cada día se está observando el aumento de infecciones causadas por levaduras del género *Candida*, que ahora son catalogadas como patógenos emergentes. Tal es el caso de *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* entre otras [3].

Un gran número de estudios ha demostrado que los factores de virulencia intervienen en los procesos de colonización e infección de *C. albicans*. No sucede así con otras levaduras oportunistas, donde estos factores sólo han podido ser detectados en algunas especies, como en *C. tropicalis* y *C. glabrata* por ejemplo [4,5].

Las células microbianas poseen enzimas hidrolíticas constitutivas e inducibles que ayudan a la invasión de los tejidos del hospedero. Particularmente, las fosfolipasas y proteasas juegan un papel importante en el daño causado a las membranas celulares, ya que tienen la capacidad de degradar los lípidos y proteínas que las constituyen. La producción o no de estas enzimas, consideradas elementos fundamentales e integrales para la patogénesis de las levaduras, puede ser un importante determinante en la capacidad de estos microorganismos de producir infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos [6,7].

Mientras que la actividad enzimática de *Candida albicans* ha sido bien estudiada, no sucede lo mismo con otras levaduras del género *Candida*. La actividad de proteasas y fosfolipasas ha sido detectada particularmente en *C. glabrata* y *C. tropicalis* y poco se sabe de la producción de estas enzimas en otras levaduras [8].

En Venezuela son escasos los estudios en relación a este particular. Este trabajo pretende aportar información im-

portante acerca de la producción de proteasas y fosfolipasas en aislados venezolanos de *Candida* spp., utilizando medios de cultivo sólidos, sencillos y con una metodología fácil de implementar en un laboratorio, para tratar de establecer si existe una relación entre la producción de estas enzimas y la patogenicidad de estas levaduras.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar y comparar la actividad de fosfolipasas y proteasas de cepas de *Candida* spp., y correlacionar la actividad enzimática con el sitio de aislamiento de las levaduras.

Materiales y métodos

Muestras

Se estudiaron 95 cepas de levaduras, procedentes de diversos aislamientos clínicos, conservadas en la Micoteca del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" por el Método de Castellani [9]. Su distribución se presenta en la Tabla 1. Todas las cepas fueron identificadas siguiendo la metodología convencional [10]:

1. Pruebas rápidas: producción de tubo germinal y formación de clamidosporas (específicas para *Candida albicans*).
2. Pruebas bioquímicas: asimilación de carbohidratos.
3. Pruebas complementarias: termotolerancia, resistencia a la actidiona y producción de ureasa.

Para la realización de los ensayos, se repicaron las cepas en tubos de agar Sabouraud Dextrosa y se incubaron a 25-28°C por 24 horas.

Tabla 1. Distribución y procedencia de las cepas de *Candida* spp.

Procedencia	Microorganismos							Total
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida no albicans</i>						
	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida sake</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	
Sec. Oral	32	1		2			2	39
Sec. Vaginal	10		1				1	13
Sangre	1	1	4				1	12
Orina	3	5			1		2	17
Liq. Peritoneal		1		1	3		5	12
Lav. Bronquial		1				1		2
Total	46	9	5	3	4	1	11	95

Métodos

La producción de fosfolipasas se evaluó de acuerdo al ensayo de Polak [11], con el método descrito por Price y col., [12], usando dos medios de cultivo a base de yema de huevo: Agar Extracto de Malta-Yema de Huevo (MEA-YEA) y Agar Sabouraud Dextrosa-Yema de Huevo (SDA-YEA) [8, 13]. La actividad de proteasas se evaluó según el ensayo de Aoki y col., [14], utilizando un medio de cultivo a base de albúmina sérica bovina: Yeast Carbon Base-Albúmina Bovina (YCB-BSA) [15].

Evaluación de actividad de fosfolipasa

Las levaduras de 24 horas de incubación se inocularon en placas con los medios de cultivo MEA-EYA y SDA-EYA, y se incubaron a 37°C. Se midieron los diámetros de las colonias y de las zonas de precipitación generadas por la actividad enzimática a las 24, 48 y 72 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las medidas y los cálculos de la actividad de fosfolipasas se hicieron de acuerdo al método descrito por Price y col. [12]. Se calculó un coeficiente de actividad enzimática (Pz) que se obtiene al dividir el diámetro de crecimiento de la colonia levaduriforme entre el diámetro de la zona de producción enzimática. El

índice Pz puede tomar valores que van de cero a uno, correspondiendo aquellos más próximos a cero a niveles máximos de actividad enzimática. Inversamente, aquellos índices con valores próximos a uno son indicativos de un bajo nivel en dicha actividad. En cepas que no muestran actividad enzimática, el índice Pz es igual a uno. Estos coeficientes posteriormente se agrupan en 4 clases, lo que permite hacer una medición semicuantitativa de la actividad enzimática:

$$Pz = \frac{\text{DIÁMETRO DE LA COLONIA}}{\text{DIÁMETRO DE LA ZONA DE PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA}}$$

0.9 – 1.0	(+)
0.89 – 0.80	(++)
0.79 – 0.70	(+++)
< 0.69	(++++)

Evaluación de la actividad de proteasas

Se inocularon las placas con cada una de las cepas de levadura en el medio de cultivo YCB-BSA, y se incubaron a 37°C. Los diámetros de las colonias y de las zonas de precipitación generadas por la actividad enzimática se midieron a las 24, 48 y 72 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las medidas y los cálculos de la actividad proteolítica se hicieron de acuerdo al método descrito por Price y col. [12], mencionado anteriormente.

Controles

Se utilizaron cepas controles pertenecientes a la Micoteca del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", las cuales fueron evaluadas previamente para conocer su actividad enzimática.

L-412000-286	<i>Candida albicans</i>	ATCC 38696
L-412000-32	<i>Candida albicans</i>	ATCC 28367 / 36801
L-412000-156	<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258

Tabla 2. Actividad de Proteasas y Fosfolipasas de *Candida* spp. (n= 95)*.

Microorganismo	n	Fosfolipasas MEA-YEA			Fosfolipasas SDA-YEA			Proteasas YCB-BSA		
		(Pz ± SD)	+	%	(Pz ± SD)	+	%	(Pz ± SD)	+	%
<i>Candida albicans</i>	46	0,574 ± 0,099	46	100	0,558 ± 0,103	46	100	0,364 ± 0,069	46	100
<i>Candida sake</i>	4	0,806 ± 0,113	3	75	0,631 ± 0,124	4	100	0,499 ± 0,173	4	100
<i>Candida lipolytica</i>	1	1,000 ± 0,000	-	-	1,000 ± 0,000	-	-	1,000 ± 0,000	-	-
<i>Candida krusei</i>	3	0,482 ± 0,084	3	100	0,425 ± 0,103	3	100	0,343 ± 0,093	3	100
<i>Candida glabrata</i>	9	0,554 ± 0,140	9	100	0,500 ± 0,094	8	89	0,273 ± 0,054	9	100
<i>Candida parapsilosis</i>	11	0,632 ± 0,118	11	100	0,552 ± 0,153	11	100	0,471 ± 0,161	11	100
<i>Candida guilliermondii</i>	5	0,598 ± 0,122	5	100	0,533 ± 0,173	5	100	0,504 ± 0,173	5	100
<i>Candida tropicalis</i>	16	0,506 ± 0,111	16	100	0,568 ± 0,095	13	81	0,415 ± 0,098	16	100
Total	95	0,644 ± 0,098	93	98	0,596 ± 0,105	90	95	0,484 ± 0,103	94	99

* Cada ensayo se realizó por triplicado. Pz: Índice de actividad enzimática. SD: Desviación estándar.

La distribución de los valores de Pz de los 95 aislados de *Candida* spp. ensayados se muestra en la Tabla 3. En los ensayos de actividad enzimática de proteasas para *C. albicans*, el valor mínimo de Pz obtenido se ubicó en 0,255 y el máximo en 0,509; para los ensayos de fosfolipasas utilizando el medio de MEA-YEA, el valor mínimo de Pz fue 0,289 y el máximo de 0,807; para los ensayos de fosfolipa

L-412000-157 *Candida parapsilosis* ATCC 22019

Análisis Estadístico

Una vez obtenidos los valores de las variables, se procedió a su descripción utilizando porcentajes y medidas de tendencia central como promedio y desviación estándar. Para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas al comparar las actividades enzimáticas de las cepas de *C. albicans* y de *C. no albicans*, así como diferencias en cuanto a su procedencia, se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA). Para establecer si existían diferencias en la producción de fosfolipasas al comparar los medios de cultivo MEA-YEA y SDA-YEA, se utilizó la prueba *t* de Student para muestras pareadas. En todos los análisis estadísticos se utilizaron los programas Statgraphics Plus 5.0 y Excel para Windows.

Resultados

De los 95 aislados de *Candida* spp. ensayados, 94 (99%) presentaron actividad de proteasas, 93 (98%) presentaron actividad de fosfolipasas en el medio de MEA-YEA y 90 (95%) presentaron actividad de fosfolipasas en el medio de SDA-YEA. Todos los aislados de *Candida albicans* presentaron actividad enzimática de proteasas y fosfolipasas. De las cepas de *Candida no albicans* ensayadas, *Candida lipolytica* no exhibió ningún tipo de actividad enzimática y sólo algunas cepas de *C. sake*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* no presentaron actividad de fosfolipasas detectable en los medios de cultivo utilizados para tal fin. En la Tabla 2 se presentan los resultados de las actividades de proteasas y fosfolipasas de los 95 aislamientos de *Candida* spp.

as con el medio de SDA-YEA, el valor mínimo de Pz fue 0,248 y el máximo 0,852. Para las cepas de *Candida no albicans*, en los ensayos de actividad enzimática de proteasas, el valor mínimo de Pz obtenido fue 0,208 correspondiente a una cepa de *C. glabrata* y el máximo de 1,00 correspondiente a la cepa de *C. lipolytica*; para los ensayos de fosfolipasas con el medio de MEA-YEA, el valor mínimo de Pz fue 0,344 correspondiente a una cepa de *C.*

parapsilosis y el máximo 1,00 correspondientes a la cepa de *C. lipolytica* y una cepa de *C. sake*; para los ensayos de fosfolipasas con SDA-YEA, el valor mínimo de Pz fue

0,256 correspondiente a una cepa de *C. tropicalis* y el valor máximo 1,00 correspondientes a la cepa de *C. lipolytica*, una de *C. glabrata* y tres de *C. tropicalis*.

Tabla 3. Distribución de los valores de Pz entre los aislados de *Candida* spp. (n=95).

Pz	Clase*	<i>Candida albicans</i>						<i>Candida no albicans</i>					
		Fosfolipasas MEA-YEA		Fosfolipasas SDA-YEA		Proteasas YCB-BSA		Fosfolipasas MEA-YEA		Fosfolipasas SDA-YEA		Proteasas YCB-BSA	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1,00	1 +	-	-	-	-	-	-	2	4,1	5	10,2	1	2,04
0,90 – 0,99	1 +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,80 – 0,89	2 +	1	2,2	1	2,2	-	-	5	10,2	-	-	-	-
0,70 – 0,79	3 +	10	21,7	5	10,9	-	-	3	6,1	4	8,2	1	2,04
0,60 – 0,69	4 +	7	15,2	14	30,4	-	-	8	16,3	7	14,3	4	8,2
0,50 – 0,59	4 +	15	32,6	11	24	2	4,3	14	28,6	10	20,4	8	16,3
0,40 – 0,49	4 +	8	17,4	9	19,6	7	15,2	11	22,4	14	28,6	9	18,4
0,30 – 0,39	4 +	4	8,7	4	8,7	34	74	6	12,2	7	14,3	16	32,7
0,20 – 0,29	4 +	1	2,2	2	4,3	3	6,5	-	-	2	4,1	9	18,4
0,00 – 0,19	4 +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,04

* 0,90 – 1,00: 1+; 0,80 – 0,89: 2+; 0,70 – 0,79: 3+; ≤ 0,69: 4+.

La relación entre la actividad enzimática de proteasas y fosfolipasas de *Candida* spp., el sitio de aislamiento de las levaduras y los valores de Pz obtenidos se muestra en la Tabla 4. Las levaduras aisladas de secreciones vaginales mostraron los valores de Pz más bajos, seguidos de

muestras de orina, sangre y líquido peritoneal, mientras que las levaduras aisladas de lavados bronquiales mostraron los valores de Pz más elevados para todas las actividades enzimáticas probadas.

Tabla 4. Distribución de la actividad de fosfolipasas y proteasas de *Candida* spp. aisladas de diferentes muestras clínicas.

Muestra	n	Fosfolipasas MEA-YEA (Pz ± SD)	Fosfolipasas SDA-YEA (Pz ± SD)	Proteasas YCB-BSA (Pz ± SD)
Cavidad Oral	39	0,606 ± 0,093	0,585 ± 0,089	0,380 ± 0,076
Orina	17	0,552 ± 0,139	0,529 ± 0,091	0,359 ± 0,085
Líquido Peritoneal	12	0,682 ± 0,116	0,549 ± 0,134	0,461 ± 0,160
Sangre	12	0,551 ± 0,128	0,577 ± 0,136	0,441 ± 0,121
Lavado Bronquial	2	0,690 ± 0,014	0,650 ± 0,053	0,624 ± 0,011
Secreción Vaginal	13	0,453 ± 0,098	0,481 ± 0,155	0,352 ± 0,079

Pz: Índice de actividad enzimática. SD: Desviación estándar.

Al comparar la producción de proteasas entre las cepas de *C. albicans* y las cepas de *Candida* no *albicans* utilizando la prueba de ANOVA, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0158$). Las cepas de *C. albicans* producen más proteasas que las cepas de *Candida* no *albicans*. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0063$) al evaluar el sitio de aislamiento de las levaduras y relacionarlo con la actividad de proteasas. Las levaduras aisladas de muestras de secreciones vaginales son las más productoras de proteasas, seguidas en orden decreciente por las levaduras aisladas de muestras de orina, cavidad oral, sangre, líquido peritoneal y finalmente lavado bronquial. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar la producción de proteasas de cada especie de *Candida* y relacionarlo con el sitio de aislamiento.

Al comparar la producción de proteasas entre las especies de *Candida*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas

- *C. albicans* con: *C. lipolytica*, *C. sake*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* ($p<0,05$).
- *C. lipolytica* con: *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* ($p<0,05$).
- *C. glabrata* con: *C. sake*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* ($p<0,05$).

La producción de proteasas de las especies de *Candida* en orden descendente fue: *C. glabrata* > *C. krusei* > *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. parapsilosis* > *C. sake* > *C. guilliermondii* > *C. lipolytica*. En cuanto al medio de cultivo, los halos de producción enzimática obtenidos siempre fueron claros y definidos, de fácil lectura y apreciación (Figuras 1 y 2).

Para evaluar la producción de fosfolipasas se utilizaron dos medios de cultivo y se realizó un estudio comparativo

mediante la prueba de *t* de Student para muestras pareadas, con la finalidad de determinar su utilidad.

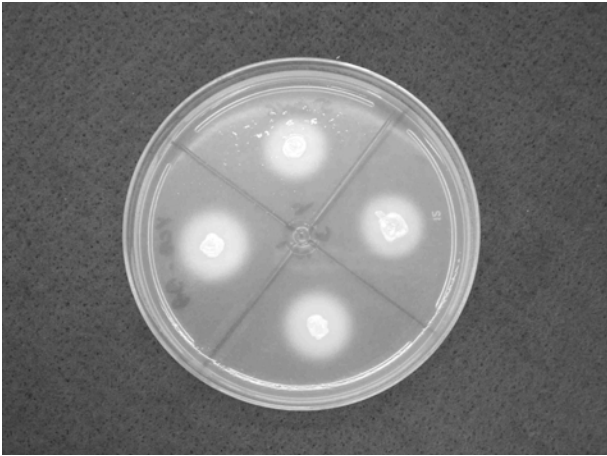


Figura 1. Producción de proteasas en YCB-BSA. Cepa de *Candida albicans* aislada de cavidad oral (Producción de proteasas 2+).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la producción de fosfolipasas utilizando los medios de MEA-YEA y SDA-YEA para *C. albicans* ($p=0,4878$) y *Candida no albicans* ($p=0,2647$). Ambos medios de cultivo son equivalentes para evaluar la producción de fosfolipasas de *Candida* spp.

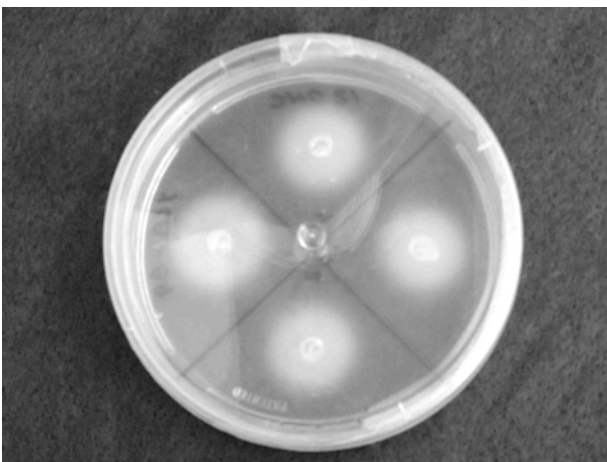


Figura 2. Producción de proteasas en YCB-BSA. Cepa de *Candida albicans* aislada de cavidad oral (Producción de proteasas 4+).

Durante la realización de los ensayos de producción de fosfolipasas, se observaron diferencias de orden cualitativo al utilizar los medios de cultivo. Con el medio de SDA-YEA (Figura 3) se facilitaba la lectura de los halos de producción enzimática, ya que se producía un halo claro y definido, mientras que el halo obtenido en el medio de MEA-YEA (Figura 4) fue más opaco, lo que dificultaba un poco más la lectura. Debido a que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas usando ambos medios de cultivo con cepas de *Candida* spp., se presentan a continuación los datos de producción enzimática de fosfolipasas obtenidos usando el medio de SDA-YEA.

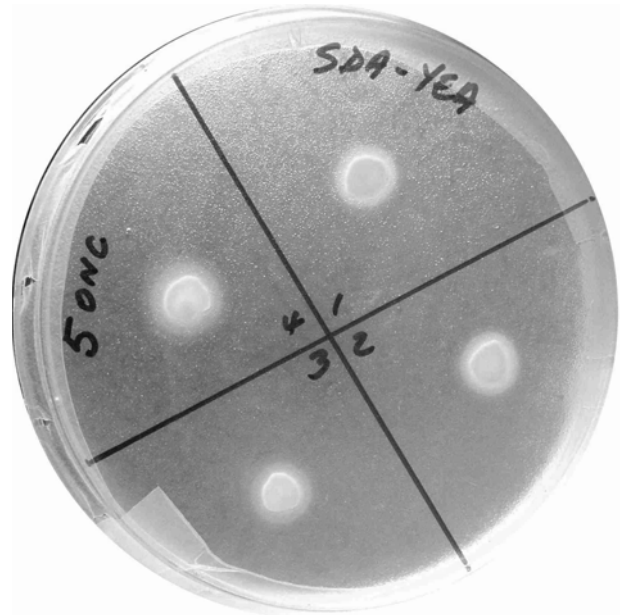


Figura 3. Producción de fosfolipasas en SDA-YEA. Cepa de *Candida albicans* aislada de cavidad oral.

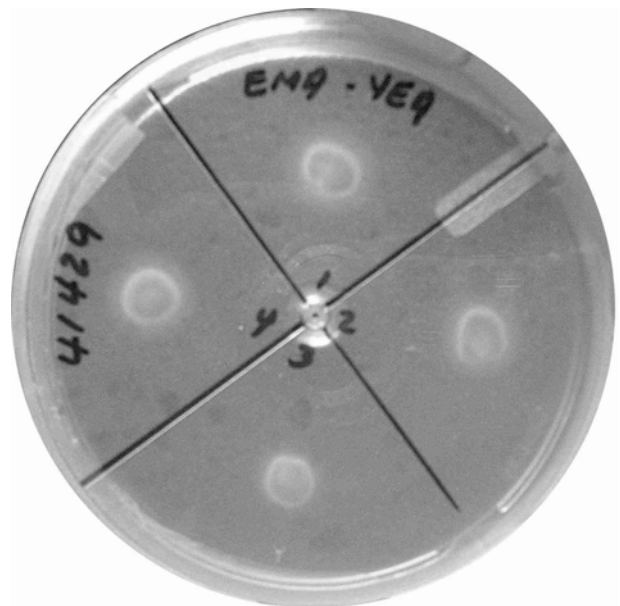


Figura 4. Producción de fosfolipasas en MEA-YEA. Cepa de *Candida albicans* aislada de cavidad oral.

Al comparar la producción de fosfolipasas, usando el medio de SDA-YEA, entre las cepas de *C. albicans* y las cepas de *Candida no albicans*, mediante la prueba de ANOVA, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,8852$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,3717$) al evaluar el sitio de aislamiento de las levaduras y relacionarlo con la actividad de fosfolipasas, pero las levaduras aisladas de muestras de secreciones vaginales son las más productoras de fosfolipasas, seguidas en orden decreciente por las

levaduras aisladas de muestras de orina, líquido peritoneal, sangre, cavidad oral y lavado bronquial.

Al relacionar la producción de fosfolipasas de cada especie de *Candida* y el sitio de aislamiento, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las especies de *Candida* aisladas de cavidad oral ($p=0,0177$), siendo *C. glabrata* la más productora, seguida de *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. albicans*. Al comparar la producción de fosfolipasas entre las especies de *Candida*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,2160$). La producción de fosfolipasas de las especies de *Candida* en orden decreciente fue: *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. parapsilosis* > *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. guilliermondii* > *C. sake* > *C. lipolytica*.

Discusión

Se considera que la producción de proteasas y fosfolipasas juega un papel importante en la patogenicidad de los hongos oportunistas. Existe un gran número de publicaciones en las cuales se examina la producción de estas enzimas hidrolíticas en aislados de *C. albicans* y su papel en la patogénesis de la candidosis invasiva, ya que están relacionadas con su virulencia, pero, existen escasos reportes en la literatura que investiguen su existencia y su relación con la virulencia en otras especies de levaduras. Se ha detectado actividad enzimática de fosfolipasas y proteasas en otras especies de levaduras como *Cryptococcus neoformans* [16], *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. kefir* entre otras [8].

Diferentes métodos han sido usados por los investigadores para medir la actividad de proteasas o fosfolipasas en levaduras [13,17]. En este estudio, la actividad de ambas enzimas fue examinada simultáneamente en las mismas cepas de levaduras, utilizando medios de cultivo sólido, siendo además medidas y calculadas [8,12].

Todas las cepas de *C. albicans* en este estudio mostraron actividad de proteasas, resultados muy similares a los de otras investigaciones. De Bernardis y col. [18] reportaron una elevada producción *in vitro* de proteasas en *C. parapsilosis* aisladas de muestras de secreciones vaginales. Yamamoto y col. [19] encontraron que 13 de 18 cepas de *C. tropicalis* y 11 de 18 cepas de *C. parapsilosis* presentaban actividad proteolítica, mientras que ninguna de las cepas de *C. glabrata* ensayadas manifestó esta actividad. Kantarcioglu y Yucel [8] encontraron que 3 de 4 *C. lipolytica*, 2 *C. parapsilosis*, 4 *C. kefir* y 9 *C. tropicalis* mostraron actividad de proteasas. En este estudio, 48 de las 49 cepas de las diferentes especies de *Candida* no *albicans* ensayadas mostraron actividad de proteasas: 4 *C. sake*, 3 *C. krusei*, 9 *C. glabrata*, 11 *C. parapsilosis*, 5 *C. guilliermondii* y 16 *C. tropicalis*; la única excepción fue *C. lipolytica*. Posiblemente la diferencia entre estos resultados se debe al uso de diferentes cantidades de cada especie de levadura en las investigaciones y las discrepancias observadas en la actividad enzimática pueden ser atribuidas a variaciones intra especie.

Las levaduras aisladas de muestras de secreciones vaginales, presentaron la mayor producción enzimática, seguidas de muestras de orina, cavidad oral, sangre, líquido peritoneal y por último lavados bronquiales, pudiéndose establecer una relación entre la actividad enzimática y el sitio de aislamiento de las levaduras. Estos resultados son similares a los obtenidos por De Bernardis y col. [18] pero diferentes a los obtenidos por Kantarcioglu y Yucel [8], que reportan que las levaduras aisladas de muestras de tracto respiratorio presentan mayor actividad de proteasa, seguidas de muestras urogenitales y cavidad oral, mientras que las levaduras aisladas de muestras de sangre no presentaron actividad enzimática de proteasa. Estos resultados probablemente están relacionados con la especie y variaciones intra especie de la levadura aislada en cada muestra. Resultados de varias investigaciones han determinado que los aislamientos con elevada actividad proteolítica son más virulentos que aquellos que no la poseen o tienen baja producción enzimática, pero no suministran suficientes datos para relacionar el sitio de infección con la especie de levadura aislada, por lo tanto la producción de proteasa debe ser considerada como un factor de virulencia más no el único factor que influye sobre la patogenicidad de las levaduras. Además, debe tomarse en cuenta el estado inmune del hospedero, que tiene una marcada influencia en la aparición de los factores de virulencia de *Candida* spp.

En cuanto a la actividad de fosfolipasas, Samaranayake y col. [20] hallaron que el 73% de los aislados de levaduras que estudiaron presentaban actividad de fosfolipasas, mientras que Kantarcioglu y Yucel [8] obtuvieron un 79% de actividad de fosfolipasas en sus aislados. En este estudio, utilizando dos medios de cultivo sólidos para evaluar la actividad *in vitro* de producción de fosfolipasas, se obtuvo un 98% de actividad en el medio de MEA-YEA y 95% en el medio de SDA-YEA, porcentajes muy superiores a los obtenidos por los citados autores. Estas discrepancias en los porcentajes de positividad se relacionan probablemente con las diferentes especies y cantidades de levaduras usadas en los estudios, así como a variaciones intra especie.

Samaranayake y col. [20] encontraron que de 41 *C. albicans* ensayadas, 30 (73%) presentaron actividad de fosfolipasas y ninguna de las cepas de *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* mostraron esta actividad. En este estudio, todas las cepas de *C. albicans* mostraron actividad de fosfolipasas en los dos medios de cultivo usados y sólo algunas cepas de *C. tropicalis*, *C. sake*, *C. glabrata* y *C. lipolytica* no mostraron actividad de fosfolipasas detectable en alguno de ellos. Al comparar ambos medios de cultivo utilizados para la detección *in vitro* de la actividad de fosfolipasas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto, ambos medios son equivalentes para detectar la actividad de la citada enzima.

C. glabrata y *C. krusei* han sido reconocidas como patógenos emergentes, sobre todo a nivel nosocomial y en pacientes inmunocomprometidos. La actividad de fosfolipasas se ha reportado como un factor de virulencia importante en pacientes con candidemia causada por *C. glabrata*

[6]. Por otra parte, escasas investigaciones reportan actividad de fosfolipasas y proteasa en *C. krusei*. En el estudio de Kantarcioglu y Yucel [8], sólo 1 de 4 *C. glabrata* produjo fosfolipasas y ninguna de las *C. krusei* mostró esta actividad enzimática; adicionalmente, ninguna de las dos especies presentó actividad de proteasa. De forma similar, un estudio reciente reporta que cepas de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *C. tropicalis*, aisladas de muestras de secreciones vulvovaginales, no mostraron actividad de fosfolipasas y proteasa [21]. Las investigaciones de Fu y col., [22] por el contrario sugieren la presencia de un gen que codifica actividad de lipasa en *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, mientras que el trabajo de Clancy y col. citados por Kantarcioglu y Yucel [8], observaron que *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. krusei* presentan actividad de fosfolipasas. En este estudio, todas las cepas estudiadas de *C. glabrata* y *C. krusei* produjeron actividad de fosfolipasas y proteasas, así como las cepas de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e inclusive *C. guilliermondii*, algunas veces mucho mayor que la detectada para *C. albicans*. Los resultados de estas investigaciones, incluyendo el presente estudio, son contradictorios en relación con las especies de *Candida* no *albicans*. Probablemente se relacionen con variaciones intra especie en estas levaduras, el sitio de aislamiento y las condiciones inmunes del hospedero, pero al no poseer los datos completos sobre los pacientes, no se pudo establecer una relación sobre este particular.

Al relacionar el sitio de aislamiento de la levadura con la producción de fosfolipasas, Kantarcioglu y Yucel (8) no encontraron diferencias estadísticamente significativas, pero las levaduras aisladas del tracto respiratorio presentaron la mayor producción enzimática, seguidas por las levaduras aisladas de muestras urogenitales, cavidad oral y sangre. Los resultados obtenidos en este estudio son muy similares, ya que tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al relacionar la actividad de fosfolipasas con el sitio de aislamiento de las levaduras y se pudo determinar que las levaduras aisladas de muestras de secreciones vaginales presentaron la mayor actividad enzimática, seguidas por las levaduras aisladas de muestras de orina, líquido peritoneal, sangre, cavidad oral y lavado bronquial.

De acuerdo con los resultados obtenidos por investigaciones previas y los presentados en este estudio, se necesitan más investigaciones que evalúen las actividades enzimáticas de proteasas y fosfolipasas, sobre todo en aislamientos de *Candida* no *albicans* provenientes de diferentes sitios anatómicos, para conocer su contribución con la virulencia asociada a la candidosis.

El uso de medios de cultivo sólidos para la determinación de la actividad enzimática de proteasas y fosfolipasas, puede tener una gran aplicabilidad en el laboratorio de micología, unido a pruebas de rutina como el examen directo y el cultivo, para la identificación de especies de *Candida* aisladas de diferentes sitios anatómicos, ayudando a establecer criterios para diferenciar entre su estado comensal o patógeno [23].

Conclusiones

1. Las cepas de *Candida albicans* poseen más actividad de proteasas que las especies de *Candida* no *albicans*.
2. Se estableció una relación entre la actividad de proteasas de *Candida* spp. y el sitio de aislamiento, pero no se pudo establecer una relación entre la actividad de proteasa de cada especie de levadura y el sitio de aislamiento de las mismas.
3. *Candida glabrata* fue la especie del género *Candida* que mostró la mayor actividad enzimática de proteasas.
4. Los resultados obtenidos al comparar la actividad de fosfolipasas de *Candida albicans* y *Candida* no *albicans* fueron similares en este estudio.
5. No se pudo establecer una relación entre la actividad de fosfolipasas y el sitio de aislamiento de las levaduras. Sólo se estableció una relación entre la producción de fosfolipasas de las especies de *Candida* aisladas de cavidad oral.
6. Los medios de cultivo MEA-YEA y SDA-YEA pueden ser utilizados indistintamente para evaluar la actividad enzimática de fosfolipasas en *Candida* spp.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Fonacit por el financiamiento parcial de esta investigación (Proyecto Lab N° 2000001587).

Referencias

- [1] Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 90's. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11: 287-291.
- [2] Perfect JR. Fungal virulence genes as targets for antifungal chemotherapy. Antimicrob Agents Chemother 1995; 40: 1577-83.
- [3] Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 462-78.
- [4] Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. Annu Rev Microbiol 1991; 45: 187-218.
- [5] Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 130-80.
- [6] Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 122-43.
- [7] Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses 2000; 44: 361-7.
- [8] Kantarcioglu SA, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses 2002; 45: 160-5.
- [9] Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further Researches. I. Trop Med Hyg. 1967; 70: 181-4.
- [10] Lodder J. The Yeasts. A taxonomic study. J. Lodder Editor. North-Holland/American Elsevier. 1974. 34-113 pp.

- [11] Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses* 1992; 35: 9-16.
- [12] Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 7-14.
- [13] Echeverría A, Durante AG, Arechavala A, Negroni R. Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad de fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 95-8.
- [14] Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T. Comparative pathogenicity of wild-type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zol Bakl* 1990; 273: 332-43.
- [15] De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G, Quinti I, et al. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* 1996; 64: 466-71.
- [16] Vidotto V, Sinicco A, Di Fraia D, Cardaropoli S, Aoki S, Ito-Kuwa S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1996; 136: 119-23.
- [17] Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 1990; 58: 508-14.
- [18] De Bernardis F, Mondello F, San Milan R, Ponton J, Casone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3481-6.
- [19] Yamamoto T, Nohara K, Uchida K, Yamaguchi K. Purification and characterization of secretory proteinase of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 1992; 36: 637-41.
- [20] Samaranyake LP, Racsid JM, MaxFarlane TW. Factor affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia* 1984; 22: 201-7.
- [21] Aal-Ravi N, Kavanagh K. Characterization of yeasts implicated in vulvovaginal candidosis in irish women. *Br J Biomed Sci* 1999; 56: 99-104.
- [22] Fu Y, Ibrahim AS, Fonzi W, Zhan X, Ramos CF, Ghanoum MA. Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology* 1997; 143: 331-40.
- [23] Chakrabarti A, Nayak N, Talwar P. In vitro proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia* 1991; 114: 163-8.