

DETECCION DE LA ENZIMA B-GLUCOSIDASA EN SEIS ESPECIES DEL GENERO CANDIDA

A. Niebla, Z. Mazorra* y E. Hernández.**

Centro de Química Farmacéutica, *Universidad de la Habana, **Hospital Pediátrico "Juan M. Márquez."

Recibido: 17 de marzo de 1992.

RESUMEN. Se estudió la presencia de la enzima β -glucosidasa en 107 cepas pertenecientes a seis especies del género *Candida*, con el objetivo de comprobar su papel como marcador enzimático en el diagnóstico de las especies *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*; empleándose para ello, dos modelos experimentales, uno cualitativo y uno cuantitativo. La β -glucosidasa fue detectada en las seis especies estudiadas con una alta frecuencia, lo que habla en detrimento de su papel como marcador enzimático de una especie del género, por estar presente en todas las especies ensayadas.

ABSTRACT. The presence of β -glucosidase was studied in 107 strains belonging to six species of the *Candida* genus, in order to test its value as an enzymatic marker in the diagnosis of the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* species. In this study a qualitative and quantitative experimental design was employed. β -glucosidase was detected with a high frequency in all species evidencing its uselessness as a marker of one of these species. On the other hand, this enzyme could be a marker of the *Candida* genus since it is present in all the species tested.

INTRODUCCION

Los perfiles enzimáticos han sido usados para diferenciar distintos bitipos del género *Candida*^{1,2} y más recientemente, para identificar levaduras importantes en la clínica.³⁻⁷ Estos perfiles se obtienen por liberación enzimática de grupos cromógenos o fluorógenos a partir de sustratos enzima específicos.⁴⁻⁷

Las pruebas enzimáticas de esta clase, no dependen del crecimiento de la levadura, están menos sujetas a errores interpretativos y permiten una identificación más rápida que los métodos convencionales de asimilación de carbohidratos.⁴

Se ha descrito que la enzima β -glucosidasa aparece con una alta frecuencia en la especie *Candida albicans*⁴. Por otra parte, se ha reportado esta enzima como marcador enzimático de *Candida parapsilosis*⁵, con gran valor potencial para su diagnóstico. De ser así, la enzima β -glucosidasa no constituye un marcador enzimático que permite la identificación hasta especie, pues se presentaría de manera simultánea en dos microorganismos diferentes pertenecientes a un mismo género.

Este trabajo se realizó con el objetivo de verificar si la β -glucosidasa está presente en una o ambas especies y si realmente constituye un marcador que las diferencia dentro del género *Candida*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas empleadas

Se emplearon un total de 107 cepas pertenecientes a las siguientes especies: *Candida tropicalis* (19), *Candida guilliermondii* (13), *Candida pseudotropicalis* (16), *Candida parapsilosis* (27), *Candida albicans* (21), *Candida stellatoidea* (10) y *Candida krusei* (1), las cuales fueron obtenidas a partir de aislamiento clínicos de pacientes hospitalizados.

Todas las cepas aisladas fueron mantenidas en cuñas de agar Sabouraud-dextrosa(ASD) a 4 °C hasta su uso, siendo transferidas a ASD fresco, y caldo Sabouraud e incubadas a 37 °C, durante 24 a 48 h antes de su empleo en el estudio.

Las especies analizadas fueron clasificadas de acuerdo con los procedimientos morfológicos y fisiológicos estándar⁸

(resistencia a la actidiona, reducción del tetrazolium, fermentación y asimilación de los azúcares glucosa, lactosa sacarosa, maltosa, galactosa, trealosa y rafinosa) en los laboratorios de micología de los hospitales donde fueron aisladas las cepas.

Determinación enzimática

Los ensayos experimentales de la actividad β -glucosidasa se llevaron a cabo con el sustrato 4-metilumbelliferyl β -D-glucopiranosídico (MUGLUP), de la Koch-Light Co, preparado en fresco, a una concentración 2,5 mmol en amortiguador fosfato(0,1 mol/L, pH 6,45)/dimetilsulfóxido,10 mL/200 μ L.

Para la determinación enzimática se emplearon dos metodologías:

I. Determinación cualitativa en medio líquido amplificando la respuesta por crecimiento del germen. Para el desarrollo de este método, se empleó un medio de cultivo diseñado en el laboratorio con la composición siguiente:

	(g/L)
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	20,0
MUGLUP	0,6
Ap H6 ,8-7e na guad estilada.	

Se tomó una asada del cultivo crecido en ASD (24-48 h), y se transfirió a 1 mL del medio de cultivo anteriormente descrito, incubándose durante 24 h a 30 °C . A continuación se añadieron 100 μ L de NaOH 0,1 mol/L, se agitó y se observó la posible fluorescencia bajo una lámpara de luz ultravioleta de 366 nm (tipo A 409,P.W. Allen and Company).

En cada corrida se montó un control positivo con una cepa de *Candida parapsilosis* que tenía altos niveles de la enzima y otro negativo con una cepa de *Candida krusei*. Las determinaciones se registraron como valores de una a tres cruces de intensidad fluorescente.

II. Determinación cuantitativa a partir de células crecidas en medio líquido. Se tomaron 100 μ L de cultivo de 24-48 h en caldo Sabouraud y se centrifugaron a 12 000 r/min durante 2 min . Se eliminó el sobrenadante y se añadió al pel-

llet 200 μL de la solución del sustrato. Se resuspendió y se incubó a 40 y a 23 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con 800 μL de amortiguador carbonato 0,5 mo/L, pH 10,2, y se realizó la determinación en un fluorímetro Corning-Ell-244 (ajustado previamente con un estándar de sulfato de quinina), a 365 nm de excitación y 448 nm de emisión. En cada corrida se montaron controles positivos y negativos como en el método anterior.

La incubación a 23 °C, se introdujo para establecer una comparación con los resultados descritos por Catherine Smitka⁵, quien obtuvo diferenciación de *Candida parapsilosis* con respecto a las demás especies, al bajar la temperatura de incubación de 37 °C a temperatura ambiente.

Determinación de la concentración adecuada del sustrato para el análisis enzimático

Se determinó la concentración óptima del sustrato mediante el cálculo de la constante de Michaelis-Menten (K_m) por el método de Lineweaver-Burk⁹ en un rango de concentración entre 0,23 y 2,95 mmol/L, utilizando para este estudio una cepa de *Candida parapsilosis* y siguiendo la metodología II, excepto para la temperatura de incubación que fue de 37 °C.

Selección de la temperatura para la determinación de la actividad enzimática

Se tomaron 10 mL de un cultivo crecido 24 h en caldo Sabouraud, en condiciones de agitación a 30 °C; se centrifugaron a 4 000 r/min durante 10 min y el sedimento se resuspendió en 5 mL de amortiguador fosfato 0,1 mol/L, pH 6,45. Despues de dos lavados con el amortiguador, se resuspendió en 5 mL de éste y se añadió 1 g de perlas de cristal ($d = 0,45$ mm). Se realizó la ruptura celular en un equipo vortex mixer, alternando un minuto de agitación con otro de reposo en baño de hielo, hasta completar los 5 min.

Posteriormente, se centrifugó a 400 r/min durante 5 min y el sobrenadante se empleó para la determinación enzimática, siguiendo la metodología II, pero variando las temperaturas de incubación entre 25 y 60 °C.

Determinación del pH óptimo para el análisis de la actividad enzimática

Para este estudio se emplearon los tampones siguientes: acetato, fosfato, citrato y borato. Todos a una concentración de 0,1 mol/L.

Para la ruptura celular se empleó la misma metodología que en el experimento anterior, con la diferencia de que se partió de 20 mL de un cultivo, el cual se resuspendió en un volumen de 10 mL de amortiguador fosfato y se repartió 1 mL de esta suspensión en cada tubo eppendorf (10 tubos).

Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 4 000 r/m, 10 min y se añadió a cada sedimento 0,5 mL de los tampones a diferentes pH con 0,1 g de perlas de cristal ($d = 0,45$ mm), hasta cubrir todos los puntos de la curva, en un rango desde 4,6 hasta 8 unidades de pH. A partir de este punto, se siguió la misma metodología, obteniéndose al final 10 extractos enzimáticos crudos, cada uno con un pH diferente.

Para la determinación enzimática se empleó la metodología II, sustituyendo las células por 100 μL de extracto enzimático, incubando a 37 °C y deteniendo la reacción con 0,7 mL de amortiguador carbonato.

También se caracterizó, la zona de pH con máxima actividad para la enzima, siguiendo el mismo procedimiento, pero

empleando para ello el amortiguador fosfato, con valores de pH entre 6,4 y 6,8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado del estudio de normalización de las condiciones para la determinación enzimática, se obtuvo un valor de 1,3 mmol/L para la constante de Michaelis-Menten. La figura 1 muestra que a valores de concentración iguales o superiores a 2 mmol/L la actividad enzimática se hace constante, por lo que para el estudio, se tomó 2,5 mmol/L, como concentración adecuada del sustrato.

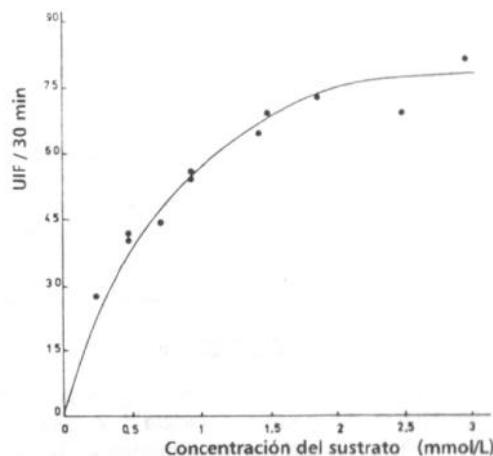


Fig. 1. Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática.
UIF cambio de unidades de intensidad fluorescente.

El estudio del efecto de la temperatura arrojó como punto de máxima actividad enzimática 50 °C, escogiéndose para el trabajo 40 °C, condición en la cual, la enzima resulta muy eficiente y no corre el riesgo de desnaturalizarse (Fig. 2).

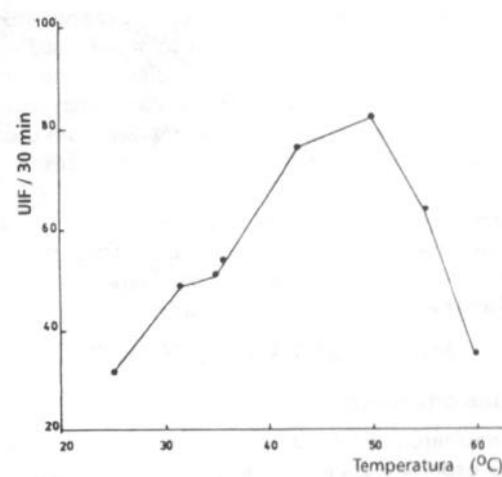


Fig. 2. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad enzimática.
UIF cambio de unidades de intensidad fluorescente.

La determinación del pH óptimo de la enzima mostró un comportamiento en forma de meseta entre 4,6 y 7,5, con un pequeño máximo entre 5,6 y 7,1, por lo que se caracterizó esta zona, obteniéndose un máximo a 6,45 con amortiguador fosfato 0,1 mol/L, pH que fue seleccionado para las posteriores mediciones (Fig. 3).

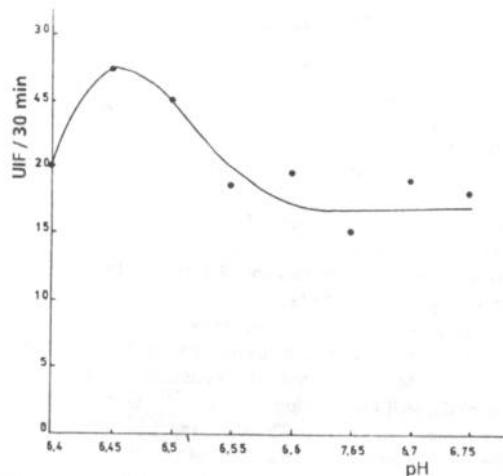


Fig. 3. Curva de caracterización de la zona de pH de máxima actividad enzimática.

UIF cambio de unidades de intensidad fluorescente.

Sobre la base de estos resultados fueron modificadas algunas de las condiciones experimentales empleadas por Catherine Smitka en su trabajo (concentración del sustrato 1 mmol/L, amortiguador fosfato pH 7; 0,1 mol/L, temperaturas de incubación: 37 °C y ambiente), con el objetivo de aumentar la sensibilidad y eficiencia del método II.

Los resultados correspondientes a la determinación de la enzima β -glucosidasa, empleando los métodos I y II se pueden observar en la tabla I.

TABLA I
Resultados de la determinación de la enzima β -glucosidasa empleando los métodos I y II

Especies	Cepas	Cepas positivas (%)		
		Método I (30 °C)	Método II 40 °C	23 °C
<i>C. tropicalis</i>	19	100,0	100,0	100,0
<i>C. guillermondii</i>	13	61,5	100,0	61,5
<i>C. pseudotropicalis</i>	16	100,0	100,0	68,7
<i>C. parapsilosis</i>	27	100,0	100,0	88,8
<i>C. albicans</i>	21	100,0	81,0	0
<i>C. stellatoidea</i>	10	100,0	70,0	0

Método I. Determinación cualitativa en medio líquido amplificando la respuesta por crecimiento del germen.

Método II. Determinación enzimática cuantitativa a partir de células crecidas en medio líquido.

Empleando el método I se detectó actividad en el 100 % de las cepas en cada especie estudiada, excepto en *Candida guillermodii* que fue de un 61,5 %. A pesar de la disminución, este valor continuó siendo muy alto.

Este método permite detectar la actividad enzimática muy eficientemente, pues el microrganismo emplea el sustrato como nutriente durante su crecimiento por lo que la respuesta se amplifica, a diferencia del método II que detecta si la enzima está presente o no en sus niveles constitutivos en la célula y la efectividad disminuye, pues está condicionada por el proceso de permeabilización celular.

Al emplear el método II y una temperatura de incubación de 40 °C, se detectó actividad en el 100 % de los cepas por cada especie estudiada, excepto para *Candida albicans* (81

%) y *Candida stellatoidea* (70 %), cuyos valores resultaban muy altos también. Estos resultados son muy semejantes a los obtenidos por Catherine Smitka,⁵ quien reportó una fuerte fluorescencia a 37 °C para todas las especies ensayadas.

Al disminuir la temperatura a 23 °C, se mantuvo el 100 % de cepas positivas para *Candida tropicalis*. El resto de las especies redujo su positividad, no obteniéndose ninguna cepa con actividad de β -glucosidasa en los casos de *Candida albicans* y *Candida stellatoidea*. Aún con la disminución de la temperatura no se logró la selectividad esperada para una especie, ya que se detectaron altos niveles de actividad enzimática (> 50 %) en cuatro de las seis especies estudiadas.

Estos resultados no coinciden con los reportados por Catherine Smitka,⁵ ya que en su estudio, al incubar a temperatura ambiente, sólo se obtuvo una fluorescencia intensa para la especie *Candida parapsilosis*, mientras que el resto presentó ausencia o fluorescencia muy débil.

Las diferencias observadas pudieran deberse a las pequeñas ligeras variaciones que se realizaron en las condiciones de la determinación enzimática (concentración del sustrato, temperatura de incubación, pH del amortiguador, etc.), pues resultados preliminares obtenidos por D.G. Bobey y G.M. Ederer,¹⁰ y por C. Smitka,⁵ empleando diferentes sistemas amortiguador-sustrato a bajo pH, demostraron que la actividad β -glucosidasa no fue significativa en *Candida parapsilosis* bajo ciertas variaciones en las condiciones de la determinación.

Por otra parte, al disminuir la temperatura de incubación se aleja la zona de máxima actividad de la enzima, disminuyendo su eficiencia, y por tanto, la sensibilidad del método II. En *Candida albicans* y *Candida stellatoidea*, se redujo la actividad a cero, lo que indica, que en estas especies probablemente la enzima tiene muy baja actividad a esta temperatura, o que el proceso de permeabilización pierde eficiencia a temperatura ambiente, debido quizás, a la diferencia en la composición de la pared celular, que varía ligeramente de una especie a otra.

Los autores M.C. Roman y J.L. Sicilia,¹ y M.I. Williamson,² no encontraron actividad β -glucosidasa en 339 cepas aisladas de *Candida albicans*. Otros estudios realizados por Itzhack Polacheck⁴ acerca de esta misma actividad en 100 cepas de *Candida albicans*, reportaron sin embargo, actividad en todas las cepas, encontrándose la mayor parte de la actividad detectada en el citoplasma, hecho descrito con anterioridad por S.P. Ram,¹¹ lo que podría explicar la importancia de la permeabilización en esta determinación.

En un estudio comparativo realizado por I. Polacheck entre células de *Candida albicans* provenientes de dos territorios diferentes, se detectaron células con deficiencias en el sistema de transporte del sustrato, lo que podría explicar que algunas cepas dentro de una misma especie, no manifiesten actividad por los métodos empleados.⁴

La no detección de actividad en el total de cepas de *Candida albicans* ensayadas, pudiera deberse al tipo de sustrato empleado (derivado de la metilumbelliferon), el cual se diferencia totalmente en estructura de los utilizados por Itzhack Polacheck⁴ (derivados cromogénicos del p-nitrofenol y la naftalina), para los cuales la enzima muestra diferente afinidad.

Aplicando las dos metodologías y variando la temperatura, no se obtuvo el efecto reportado por Catherine Smitka para *Candida parapsilosis* y tampoco se observó un gran valor diagnóstico para *Candida albicans*, pues no pertenece al grupo de especies que mantuvo altos porcentajes de positividad,

dad, como reportó I. Polacheck.⁴ Además, no se observó especificidad, pues en general, la actividad enzimática fue grande independientemente del método, la temperatura y la especie empleada.

CONCLUSIONES

La β -glucosidasa fue detectada con una alta frecuencia, en las seis especies estudiadas, lo que no concuerda con su papel como marcador enzimático para el diagnóstico de las especies *Candida albicans* o *Candida parapsilosis*, por carecer de especificidad para una en particular.

Por otra parte, pudiera constituir un marcador enzimático del género por estar presente en todas las especies ensayadas, para lo cual resultaría necesario un estudio más profundo, extendido a un mayor número de cepas, así como a una mayor diversidad de especies, incluyendo una batería de diferentes sustratos específicos para la β -glucosidasa, con el objetivo de seleccionar el más adecuado en este tipo de determinación y poder arribar entonces, a conclusiones más certeras.

BIBLIOGRAFIA

1. Roman M.C. and Sicilia M.J.L. *Journal of Clinical Microbiology*, **18**, 430, 1983.
2. Williamson M.I., Samaranayake L.P. and MacFarlane T.W. *J. Med. Vet. Mycol.*, **24**, 81, 1986.
3. Abstr. Annu. Meet., American Soc. Microbiol., Washington, D. C. 337-384, 1986.
4. Itzhack Polacheck, Silverman M.P. and Muñoz E.F. *Journal of Clinical Microbiology*, **25**, 907, 1987.
5. Catherine M. Smitka and Jackson Susan G. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 203, 1989.
6. Jack L. Perry *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, 614, 1990.
7. Maurice T. Dalton *Diagn. Microbiol. Infect.*, **12**, 521, 1989.
8. Cooper B.H. and Silva-Hutner M. Yeasts of medical importance. Manual of Clinical Microbiology, 4th ed., In. E.H. Lennette, A. Bolows, W.J. Hausler, Jr., H.J. Shadomy (ed.), American society for Microbiology, Washington D. C., 526-541, 1985.
9. Lehninger Albert Enzimas: cinética e inhibición. Bioquímica, 2da. Edición, Editorial Pueblo y Educación, 195-201, 1981.
10. Bobey D.G. and Ederer G.M. *J. Clin. Microbiol.*, **13**, 393, 1981.
11. Ram S.P., Romana L.K., Sheperd M.G. and Sullivan P.A. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1227, 1984.