

ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA Y SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO A FLUCONAZOL EN AISLAMIENTOS CLINICOS Y AVIARIOS DE *Cryptococcus neoformans*

(Phospholipase activity and «in vitro» susceptibility to fluconazole in clinical and aviars isolates of *Cryptococcus neoformans*)

Gabriel Pérez C. (1), Gisela González H. (2),
M. Cristina Díaz J. (3)

(1). Facultad de Medicina, Universidad de Chile

(2). Programa Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias, Universidad de Chile

(3).- Programa de Microbiología y Micología, ICBM,

Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

mc Diaz@med.uchile.cl

Palabras clave: Fosfolipasa, *Cryptococcus neoformans*, susceptibilidad Fluconazol

Key words: Phospholipase, *Cryptococcus neoformans*, susceptibility Fluconazol

RESUMEN

Se detectó la actividad de fosfolipasa en 19 cepas clínicas y 17 aviarias de *C. neoformans* var. *neoformans*, usando Agar Sabouraud con yema de huevo, incubándose a 37°C por 5 días. Se determinó el índice Pz estableciéndose los siguientes rangos: Pz muy alto (0.9-1), alto (0.89-0.80), bajo (0.79-0.70) y muy bajo (< 0.69). El 84% de las cepas clínicas presentaron índice Pz muy bajo, el 5% bajo y 11% muy alto. Mientras en las cepas aviarias el 82% presentaron índice muy bajo y un 18% muy alto. Los valores de Pz promedio fueron muy bajos en todos los aislamientos, sin existir diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las cepas clínicas y aviarias, lo que implica una alta actividad enzimática. La susceptibilidad in vitro a Fluconazol se realizó por el método de difusión con discos y el 89,5 % de las cepas clínicas fueron sensibles y el 10,5% resistentes, mientras en las cepas aviarias, el 59% fueron sensibles, 29% sensible dosis dependiente y un 12% resistentes.

INTRODUCCION

Cryptococcus neoformans es una levadura capsulada que pertenece a los Basidiomycota (Garau, 2002) y que posee diversos factores de virulencia, entre los cuales se encuentra la fosfolipasa y por ende la produc-

ABSTRACT

Phospholipase activity was determined to 19 clinical and 17 aviars trains of *C. neoformans* var. *neoformans*, incubating the yeast for 5 days at 37° C on Sabouraud Agar supplemented with egg yolk. Pz values were determined and the following ranges were established: very high (0.9-1), high (0.89-0.80), low (0.79-0.70) and very low (<0.69). The 84% of the clinical isolates showed Pz values very low (5%) and 11% very high. On the other hand, the 82% of the aviars strains presented Pz values very low and 18% very high. Average Pz values were very low in all isolates, there were no statistically significant differences ($p > 0.05$) implying a high enzymatic activity. Susceptibility in vitro testing to Fluconazole was performed by a disk diffusion method (M44-A). The 89.5% of the clinical isolates were susceptible and 10.5% resistant, while in avian strains, 59% were susceptible, 29% susceptible dose dependent and 12% resistant.

ción de esta enzima extracelular se relaciona eventualmente con patogenicidad (Ghannoum, 2000).

Paralelamente al aumento de la población en estado de inmunodepresión, la infección por *C. neoformans* ha emergido como una causa importante de morbilidad y mortalidad, afectando especialmente a pacientes con SIDA en etapa avanzada. Actualmente, representa la causa más común de meningitis fúngica en el mundo, y es una de las levaduras más frecuentemente asociadas a infección fún-

Recibido el 30 Octubre 2008

Aceptado el 5 Diciembre 2008

gica invasora (García-Ruiz *et al.*, 2004; Warnock, 2007).

La virulencia de esta levadura es un tema ampliamente estudiado, diversas investigaciones han descrito factores de virulencia para *C. neoformans*, entre los que se encuentran la actividad fosfolipasa extracelular, la producción extracelular de melanina y de prostaglandinas, la producción de cápsula de polisacáridos y la habilidad de crecer a 37°C (Vartivarian *et al.*, 1993; Vidotto *et al.*, 1996; Chen, 1997; Casadevall *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2001; Noverr *et al.*, 2001; Perfect, 2006; Bovers *et al.*, 2008).

La fosfolipasa puede dañar las membranas celulares del hospedador generando disfunción y/o disrupción física de las membranas (Ghannoum, 2000) y jugar un rol importante en la patogénesis de este hongo oportunista (Vidotto *et al.*, 1998). Más aún, la posible asociación de producción de fosfolipasa por cepas de *Cryptococcus* virulentas ya fue reportada por Chen *et al.* (1998).

Con respecto a la actividad enzimática extracelular de fosfolipasa, Ganendren *et al.* (2006), observaron que esta es necesaria para la iniciación de la infección pulmonar, debido a que aumenta considerablemente la adhesión de la levadura al epitelio pulmonar. Santangelo *et al.* (2004), demostraron que la actividad fosfolipasa promueve la sobrevivencia y replicación de *C. neoformans* en macrófagos, lo que permite la iniciación de la infección pulmonar intersticial y que la fagocitosis mononuclear es el vehículo para la diseminación sistémica de esta levadura. Shea *et al.* (2006), observaron que la actividad fosfolipasa protege a *C. neoformans* de la acción lítica de las enzimas del fagolisosoma del macrófago activado, y que esto aumenta la diseminación de la levadura al sistema nervioso.

La actividad fosfolipasa extracelular puede detectarse en *Candida albicans* y *C. neoformans* mediante diversas metodologías, tales como agar malta más yema de huevo, agar Sabouraud glucosado más yema de huevo (SEA) (Price *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1997; Echeverría *et al.*, 2002) y pruebas específicas colorimétricas y radiométricas (Banno *et al.*, 1985; Ghannoum *et al.*, 2000). El medio de cultivo SEA constituye un método semicuantitativo, de amplia utilización y de mayor sensibilidad para la detección de esta enzima en *C. neoformans* que otros similares (Chen *et al.*, 1997 y Echeverría *et al.*, 2002).

La sensibilidad de *C. neoformans* a antifúngicos utilizados en clínica para su tratamiento puede ser evaluada *in vitro* mediante técnicas estandarizadas tales como métodos de dilución en caldo, Etest y métodos de difusión en agar, siendo este último el de mayor uso en la actualidad debido a su elevada precisión y exactitud (Barry *et al.* 2002; Pfaller *et al.*, 2004), y su mejor relación costo-efectividad en comparación con otros métodos.

Actualmente, no existe evidencia de que esta infor-

mación pueda correlacionarse con la respuesta terapéutica obtenida *in vivo*; sin embargo, un valor *in vitro* elevado de CIM puede predecir el fallo terapéutico de un antifúngico (Dannaoui *et al.*, 2006).

El objetivo de este estudio es detectar la actividad fosfolipasa en aislamientos clínicos y aviarios de *C. neoformans* y evaluar su susceptibilidad *in vitro* a Fluconazol

MATERIALES Y METODOS

Aislados de *C. neoformans* (Cn). Se utilizaron 19 cepas clínicas de *Cn*, aisladas de muestras de sangre y LCR de pacientes con criptococosis, obtenidas en diversos centros hospitalarios del país y 17 cepas de *Cn* obtenidas de deyecciones secas expuestas al medio ambiente de aves exóticas de 3 colecciones privadas y de psitácidas de un centro de rehabilitación de fauna nativa de la Región Metropolitana.

Detección de la actividad fosfolipasa. La detección y cuantificación de la actividad fosfolipasa extracelular se realizó de acuerdo al método de Price (1982), con algunas modificaciones. Las cepas aisladas previamente fueron sembradas en placas de Agar Sabouraud sin antibiótico e incubadas a 37°C durante 48 hrs, posteriormente se inocularon en placas con medio de cultivo SEA (agar sabouraud glucosado con yema de huevo estéril) e incubadas a 37 °C durante 5 días. Se midieron los diámetros de las colonias y el diámetro total de la colonia más la zona de hidrólisis producida por la actividad enzimática y se calculó la relación entre ambos valores (índice Pz de Price). A mayor valor de Pz, menor producción de fosfolipasa por la colonia. La lectura se realizó en todas las muestras a los 5 días. Cada aislado de *C. neoformans* se clasificó de acuerdo al valor de su coeficiente Pz como sigue: Pz muy alto (0.9-1); Pz alto (0.89-0.80); Pz bajo (0.79-0.70); Pz muy bajo (< 0.69).

Susceptibilidad *in vitro* a Fluconazol : se evaluó mediante el método de difusión con discos de 25 µg de Fluconazol (Becton Dickinson), de acuerdo a las recomendaciones del documento M44-A de CLSI, utilizando medio Mueller-Hinton con glucosa al 2% y azul de metileno (MHGAM). Las 36 cepas aisladas previamente fueron sembradas en placas de Agar Sabouraud sin antibiótico e incubadas a 37°C durante 48 hrs, el inóculo se preparó en solución salina y se ajustó a 0.5 en la escala Mc Farland por medida espectrofotométrica. Se incluyó *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC22019 como cepas de control de calidad.

La interpretación de los resultados se llevó a

Tabla 1: Actividad de fosfolipasa en cepas clínicas y aviarias de *C. neoformans*

Valor Pz	Actividad fosfolipasa (Índice Pz) ^a	Cepas de <i>C. neoformans</i>			
		Clínicas		Aviarias	
		n	(%)	n	(%)
< 0.69	++++	16	84,21	14	82,35
0.70 - 0.79	+++	1	5,26	-	-
0.80 - 0.89	++	-	-	-	-
0.90 -1.0	+	2	10,53	3	17,65

^a Pz muy alto (+); alto (++); bajo (+++); muy bajo (++++)

cabo de acuerdo a la tabla N° 1 de documento M44-A.

Según el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de la colonia; cada aislado frente al disco de 25 µg de Fluconazol se clasificó como sensible (≥ 19 mm), sensible dosis dependiente (15-18mm), o resistente (≤ 14 mm).

Análisis Estadístico. Con el objeto de comparar el valor Pz del día 5 de incubación de las cepas de *Cn* de origen humano y aviar, se utilizó la prueba estadística de Mann-Whitney con cálculo de U para dos muestras independientes.

RESULTADOS

Detección actividad fosfolipasa. En las 19 cepas clínicas analizadas, los valores Pz al día 5 de incubación variaron en un rango de 0,26 a 1 (Promedio Pz= 0,44± 0,21 y coeficiente de variación (CV) de 48%). Cerca del 90% presentó un índice Pz bajo o muy bajo (1 y 16 respectivamente) y 2 muestras presentaron índice Pz muy alto (0.915 y 1). Sólo en una de las cepas, no se detectó actividad fosfolipasa (Pz=1)

En las 17 cepas aisladas de deyecciones de aves, los valores Pz al día 5, variaron entre 0,28 y 1 (promedio Pz= 0,49 ± 0,264 y CV de 54%). Catorce cepas presentaron un Pz muy bajo (82%) y 3, muy alto (18%). En estas tres cepas no se detectó actividad fosfolipasa.

No hubo diferencias significativas entre los aislados clínicos y los aviarios mediante la prueba de Mann Whitney ($p > 0,05$), U=144.

Susceptibilidad in vitro a Fluconazol. En 19 cepas clínicas, 17 (89,47%) fueron sensibles mientras que 2 (10,53%) resultaron resistentes. En 17 aislamientos aviarios, 10 fueron sensibles (58,8%), 5 (29,4%) sensibles dosis dependiente y 2 (11,8%) resistentes (Tabla 2).

DISCUSION

La actividad fosfolipasa extracelular ha sido implicada en la patogénesis de infecciones bacterianas y fúngicas Ghannoum *et al.* (2000), existen numerosas publicaciones en que se ha detectado esta actividad en levaduras, principalmente en *Candida albicans* y *C. neoformans* usando diferentes métodos para medirla (Price *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1997; Echeverría *et al.*, 2002). Entre éstos, el método desarrollado por Price resulta conveniente y sencillo de utilizar en un gran número de aislados (Vidotto *et al.*, 1998). Además la correlación entre el valor Pz y la actividad fosfolipasa ya fue demostrada (Price *et al.*, 1982).

En el presente estudio, no hubo diferencias significativas en los valores Pz entre las cepas de ambos grupos, lo que concuerda con lo comunicado por Chen *et al.* (1997), y difiere de lo reportado por Vidotto *et al.* (1998), quienes si encontraron diferencias significativas.

En nuestro estudio, las cepas aviarias presentaron, con respecto a los aislados clínicos un Pz promedio mayor (0,49 vs 0,44); y un mayor número de aislados sin detección de fosfolipasa (15,8% vs 5,3%). Esta tendencia se mantuvo igual al estudio de Vidotto *et al.* (1998), donde las cepas

Tabla 2: Susceptibilidad in vitro a Fluconazol en aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans*

Cepas de <i>C. neoformans</i>	N	Susceptibilidad in vitro a Fluconazol ^a		
		%S	%SDD	%R
Clínicas	19	89,47	-	10,53
Aviarias	17	58,82	29,41	11,77

^a Sensible (S, ≥ 19 mm), sensible dosis dependiente (SDD, 15-18mm), o resistente (R, ≤ 14 mm)

aviarias también presentaron, con respecto a las cepas clínicas, un valor Pz promedio mayor (0,941 y 0,652 respectivamente) y un mayor número de cepas sin detección de fosfolipasa (74% y 4,76%, respectivamente).

La mayoría de las cepas estudiadas fueron sensibles a Fluconazol (89,5% clínicas, 59% aviarias), pero en las cepas aviarias se detectó un mayor número de cepas sensibles dosis dependiente (29%). Estos resultados son similares a los obtenidos por Pfaller *et al.* (2007), en cepas clínicas, que reportan una sensibilidad de 78% a Fluconazol. Referente a las cepas aviarias, un estudio identificó los aislados obtenidos a partir de un brote de Cryptococcosis en psitácidas en Brasil como resistentes a Fluconazol (Raso *et al.*, 2004), mientras que en Malasia, todos los *C. neoformans* aislados de deyecciones aviarias fueron sensibles al antifúngico (Tay *et al.*, 2005).

En base a lo expuesto podemos concluir que los valores de Pz promedio fueron muy bajos en aislamientos clínicos y aviarios de *Cn*, lo que se traduce en un nivel de actividad fosfolipasa alta y sugiere un rol de la enzima en la invasión al hospedero. En muy pocas cepas no se detectó la producción de fosfolipasa.

REFERENCIAS

- Banno, Y.; Yamada, T. & Nozawa, Y. (1985). Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*: separation of the three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* 23:47-54
- Barry, A.; Pfaller, M.; Rennie, R.; Fuchs, P.; Brown, S. (2002). Precision and Accuracy of Fluconazole Susceptibility Testing by Broth Microdilution, Etest, and Disk Diffusion Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1781-1784
- Bovers, M.; Hagen, F.; Boekhout, T. (2008). Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:S4-S12
- Casadevall, A.; Rosas, A.; Nosanchuk, J. (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology* 3:354-358
- Cox, G.; McDade, H.; Chen, S.; Tucker, S.; Gottfredsson, M.; Wright, L.; Sorrell, T.; Leidich, S.; Casadevall, A.; Ghannoum, A.; Perfect, J. (2001). Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* 39:166-175
- Chen, S.; Muller, M.; Zhou, Z.; Wright, L.; Sorrell, T. (1997) Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor?. *J. Infect. Dis.* 175:414-420
- Dannaoui, E.; Abdul, M.; Arpin, M.; Michel-Nyugen, A.; Piens, A.; Favel, A. (2006). Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:2464-2470
- Echeverría, A.; Durante, A.; Arechavala, A.; Negroni, R. (2002). Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 19:95-98
- Ganendren, R.; Carter, E.; Sorrell, T.; Widmer, F.; Wright, L. (2006). Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes and Infection* 8:1006-1015
- Garau, M. & Del Palacio, A. (2002). Artritis por *Cryptococcus neoformans* en receptor de trasplante renal. *Rev. Iberoam. Micol.* 19:186-189
- Ghannoum, M. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* Jan: 122-143
- García-Ruiz, J.C.; Amutio, E. & Pontón, J. (2004). Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. *Rev. Iberoam. Micol.* 21:55-62
- Noverr, M.; Phare, S.; Toews, G.; Coffey, M.; Huffnagle, G. (2001). Pathogenic Yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce Immunomodulatory Prostaglandins. *Infection and Immunity* May:2957-2963
- Perfect, J.R. (2006). *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res* 6:463-468
- Pfaller, M.; Hazen, K.; Messer, S.; Boyken, L.; Tendolkar, S.; Hollis, R.; Diekema, D. (2004). Comparison of Results of Fluconazole Disk Diffusion Testing for *Candida* Species with Results from a Central Reference Laboratory in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology* 8:3607-3612
- Pfaller, M.; Diekema, D.; Gibbs, D.; Newell, V.; Meis, J.; Gould, I.; Fu, W.; Colombo, A.; Rodriguez-Noriega, E.; the Global Antifungal Surveillance Group. (2007). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. *Journal of Clinical Microbiology* 45,6:1735-1745
- Price, M.; Wilkinson, I. & Gentry, L. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:7-14
- Raso, T.F.; Werther, K.; Miranda, E.T.; Mendes-Giannini, M.J. (2004). Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med. Mycol.* 42:355-362
- Santangelo, R., Zoellner, H.; Sorrell, T.; Wilson, C.; Donald, C.; Djordjevic, J.; Shouan, Y.; Wright, L. (2004). Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of Cryptococcosis in a murine model. *Infection and Immunity* Apr:2229-2239
- Shea, J.; Kechichian, T.; Luberto, C.; Del Poeta, M. (2006). The Cryptococcal Enzyme Inositol Phosphosphingolipid-Phospholipase C Confers Resistance to the Antifungal Effects of Macrophages and Promotes Fungal Dissemination to the Central Nervous System. *Infection and Immunity*; Oct: 5977-5988
- Tay, S.T.; Chai, H.C.; Na, S.L.; Hamimal, H.; Rohani, M.Y.

M.; Soo-Hoo, T.S. (2005). The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from birds excreta in Klan Valley, Malaysia. *Mycopathologia* 159:509-513

Vartivarian, S.E.; Anaissie, E.J.; Cowart, R.E.; Sprigg, H.A.; Tingler, M.J.; Jacobson, E.S. (1993). Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J. Infect. Dis.* 161:186-190

Vidotto, V.; Sinicco, A.; Di Fraia, D.; Cardaropoli, S.; Aoki, S.; Ito-Kuwa, S. (1996) Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 136:119-123

Vidotto, V.; Leone, R.; Sinicco, A.; Ito-Kuwa, S.; Criseo, G. (1998). Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Mycopathologia* 142:71-76

Warnock, D. (2007). Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn. J. Med. Mycol.*; 48:1-12