

Evaluación del cultivo liofilizado de *Candida albicans* utilizado en esquemas de certificaciones de calidad

Evaluation of the lyophilized culture of *Candida albicans* used in quality certification schemes

MSc. Nancy Burguet Lago, Lic. José A. Trimiño Romero, Lic. Nelson Sierra Prado

Laboratorios Liorad. UBE Laboratorios Liorad. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el laboratorio de control microbiológico de la UEB Laboratorios Liorad dispone de una colección de cultivos microbianos para la conservación de microorganismos, donde se encuentra depositada la levadura *Candida albicans* que se emplea en esquemas de certificaciones de calidad establecidos para la evaluación de ensayos como: promoción de crecimiento de los medios de cultivos, validación de técnicas microbiológicas, entre otros.

Objetivo: evaluar los resultados de la conservación de esta cepa por el método de liofilización durante un periodo de ocho años.

Métodos: para el crecimiento de la cepa se utilizó el medio de cultivo Caldo Saboraud y variantes de sustancias lioprotectoras puras como: (leche descremada al 20 %, glicerol 20 %, sacarosa al 10 % y peptona 5 %) así como la mezcla de lioprotectores (leche 10 %, sacarosa 5 %, glicerol 5 %). Se evaluó viabilidad, pureza y estabilidad genética de esta cepa durante el tiempo objeto de estudio.

Resultados: las características propias de la especie estudiada se mantuvieron inalterables con un elevado grado de pureza en todas las variantes estudiadas. En cuanto a la supervivencia, cuando se emplearon las sustancias lioprotectoras puras se evidenció una marcada disminución de la viabilidad. No así al emplear la mezcla de lioprotectores que mantuvo niveles de viabilidad por encima del límite establecido durante todo el tiempo objeto de estudio.

Conclusiones: los valores obtenidos en cuanto a la supervivencia de este microorganismo permiten inferir que para la conservación por largos periodos de tiempo la variante donde se empleó mezclas de lioprotectores resultó una buena opción para la conservación de *C. albicans*.

Palabras clave: *Candida albicans*, estabilidad, sustancia lioprotectora, liofilización.

ABSTRACT

Introduction: the microbiological control laboratory at the Basic Enterprise Unit Liorad Laboratories stores a collection of microbial cultures for the preservation of microorganisms, including the *Candida albicans* yeast used in the quality certification schemes established for the evaluation of assays such as fostering of culture medium growth and validation of microbiological techniques, among others.

Objective: evaluate the results obtained in the preservation of this strain by the lyophilization method during a period of eight years.

Methods: for strain growth, use was made of Sabouraud broth culture medium as well as variants of pure lyoprotective substances such as 20 % skimmed milk, 20 % glycerol, 10 % saccharose and 5% peptone, and the mixture of lyoprotectors (10 % milk, 5 % saccharose, 5 % glycerol). An evaluation was conducted of the viability, purity and genetic stability of the strain during the study period.

Results: characteristics typical of the study species remained unchanged with a high degree of purity in all the variants examined. As to survival, a marked reduction in viability was observed when pure lyoprotective substances were used, but not with the mixture of lyoprotectors, in which case viability levels exceeded the established limit during the entire study period.

Conclusions: the survival values obtained for this microorganism indicate that preservation for long periods with mixtures of lyoprotectors was a good option for the preservation of *C. albicans*.

Key words: *Candida albicans*, stability, lyoprotective substance, lyophilization.

INTRODUCCIÓN

Los nuevos conocimientos y tecnologías han dado una visión distinta del mundo microbiano.^{1,2} El propósito de la ciencia microbiológica debe ser preservar las especies microbianas en condiciones que permanezcan puras y homogéneas bajo situaciones que aseguren su estabilidad para su posterior estudio o utilización,³⁻⁶ por lo que es necesario emplear diferentes métodos de conservación, como la liofilización (método de elección) debido a sus numerosas ventajas, entre las que se puede resaltar la posibilidad de minimizar al máximo el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más.⁷⁻¹⁰ Todos los métodos de preservación tienen ventajas y desventajas por tanto es necesario hacer una selección del método a emplear, la que depende del microorganismo a conservar y de la disponibilidad del equipamiento con que cuente el laboratorio.¹¹⁻¹⁵

La UEB Laboratorios Liorad, (laboratorio farmacéutico destinado a la producción de parenterales asépticos líquidos y liofilizados), dispone de un área del control microbiológico que posee una colección de subcultivos de microorganismos de referencia,¹⁶ para emplear en esquemas de certificaciones de calidad como: promoción de crecimiento de los medios de cultivos, validación de técnicas microbiológicas, entre otros.^{17,18} El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar los resultados de la conservación de la cepa microbiana *Candida albicans* por el método de liofilización con el empleo de lioprotectores puros y mezclas de estos durante un periodo de ocho años.

MÉTODOS

Acervo microbiano

Subcultivo primario de la cepa de referencia *Candida albicans* depositada en la colección de cultivos microbianos del laboratorio de control microbiológico.

Recuperación de los microorganismos

La cepa levaduriforme *Candida albicans* se restituyó con 1 mL de medio de cultivo Caldo Saboraud (CS). De la suspensión del microorganismo se diseminaron en forma de césped 20 μ L, en una placa de Saboraud Dextrosa Agar (SDA), y se incubó a una temperatura de 25 °C durante 72 h. Con un asa de platino estéril se tomaron de dos a tres de las colonias crecidas y se resuspendieron en 5 mL de CS, se tomó 0,1 mL y se inoculó en una placa de SDA y se colocó en una incubadora de 25 °C durante 72 h para comprobar pureza.¹⁹

Conservación de los microorganismos

La conservación de un subcultivo de la cepa de referencia de este microorganismo se realizó por el método de liofilización. Se empleó como sustancias lioprotectoras puras: leche descremada al 20 %, glicerol al 20 %, sacarosa al 10 % y peptona al 5 %. Además se evaluó mezclas de lioprotectores (leche 10 %, sacarosa 5 %, glicerol 5 %).

Previamente a la realización del proceso de liofilización, se transfirieron 0,1 mL del cultivo a unos frascos Erlenmeyer con 100 mL de medio CS. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos y después, bajo condiciones asépticas, se desecharon el sobrenadante para poder utilizar la biomasa. A la biomasa se le añadieron 50 mL de los distintos medios de soportes de liofilización. Se homogeneizó completamente y se tomó 1 mL de la suspensión para determinar el recuento de Unidades Formoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) antes de la liofilización.¹⁹

De forma homogénea se distribuyó 2 mL de la suspensión de este microorganismo en bulbos 6R estériles. El proceso de liofilización se realizó en una liofilizadora experimental de laboratorio (marca Edward, modelo Modulyo). Una vez concluido el proceso los bulbos se almacenaron entre 2 y 8 °C.

Eficacia del método de conservación

Se restituyeron dos bulbos de la cepa en ensayo a su volumen de liofilización con 2 mL de CS, se mezclaron de forma homogénea para obtener una muestra representativa y se comprobaron las características culturales y morfológico-tintoriales, se determinó la pureza, viabilidad y se comprobó la estabilidad genética mediante pruebas bioquímicas.¹⁹

Pureza

El ensayo de pureza se realizó por observación macroscópica de las colonias crecidas (forma, tamaño y color) y las características microscópicas de las colonias crecidas del cultivo en ATS, teñidas por el método de tinción de Gram observadas al microscopio.²⁰

Viabilidad

Este ensayo se realizó antes y después de la liofilización a los 3, 6, 9 y 12 meses, a partir de aquí con una frecuencia anual hasta los 5 años, en que se varió la frecuencia cada 3 años. El método seguido fue el recuento de UFC/mL por diluciones seriadas hasta 10^{-7} y siembra en superficie de ADS. Cada dilución se sembró por triplicado. Se consideró satisfactoria una concentración celular igual o superior a 10^5 UFC/mL, valor establecido en las especificaciones de calidad del laboratorio.^{19,20}

Comprobación de la estabilidad genética (pruebas bioquímicas)

Se realizó por métodos microbiológicos convencionales como: prueba tubo germinativo, producción de clamidosporas, formación del micelio y pseudomicelio, crecimiento a 45 °C, ureasa y asimilación de azúcares tales como: glucosa (GLU), xilosa (XIL), adonitol (ADO), galactosa (GAL), inositol (INO), sorbitol (SOR), celobiosa (CEL), lactosa (LAC), maltosa (MAL), trehalosa (TREH), melecitosa (MLZ), rafinosa (RAF).²¹⁻²⁴

RESULTADOS

Una vez concluido el proceso de liofilización se observaron las características organolépticas de las pastillas obtenidas, en las variantes estudiadas (A, B, D y E) se logró una pastilla de liofilización. No así en la variante C (sacarosa 10 %) donde no se formó la pastilla, la apariencia indicaba que se había consumido y caramelizado en el fondo del bulbo, para su restitución fue necesario homogenizar varias veces para lograr una solución.

Las características macromorfológicas del cultivo evidenció la presencia de cultivo puro. Las colonias observadas coincidieron con la morfología típica de esta cepa: colonias completas de diámetro entre 1 y 3 mm, ligeramente abombadas, de consistencia cremosa, brillosas, de color blanco a crema, que no desarrollaron micelio aéreo y presentaron un olor dulzón propio del género *Candida*.^{21,22}

Los resultados de viabilidad de la cepa antes y después de la liofilización se muestran en la tabla 1. Puede señalarse que inmediatamente que concluyó la liofilización el valor de viabilidad se encontraba entre 10^7 - 10^8 UFC/mL para todas las variantes estudiadas (por encima del límite establecido igual o superior a 10^5 UFC/mL).

En la tabla 2 se muestra el recobrado de la cepa *Candida albicans* dado en (UFC/mL) durante todo el periodo objeto de estudio (ocho años), conservada en diferentes variantes. Las variantes A (leche descremada), B (glicerol), C (sacarosa) y D mostraron disminución de los niveles de viabilidad por debajo del límite especificado entre los 6 meses y 3 años de estudio. Sin embargo la variante E donde se empleó la mezcla de lioprotectores al año de conservada mostró una disminución en los valores de viabilidad de 10^8 a 10^6 UFC/mL, pero después del primer año se stabilizó y no se observa una disminución de la viabilidad.

Tabla 1. Resultados de viabilidad de la cepa de referencia *Candida albicans* antes y después de la liofilización. Liorad 2014

Microorganismos	Variantes	Viabilidad (UFC/mL)	
		Liofilización	
		Antes	Antes
<i>Candida albicans</i>	A		$1,4 \times 10^8$
	B	$7,9 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
	C		$6,0 \times 10^7$
	D		$1,2 \times 10^8$
	E		$1,5 \times 10^8$

Variantes: A (leche descremada al 20 %), B (glicerol 20 %), C (sacarosa al 10 %), D (peptona 5 %), E (leche 10 %, sacarosa 5 % y glicerol 5 %).

Tabla 2. Recobrado de la cepa *Candida albicans* durante ocho años, conservada en diferente variantes de sustancias lioprotectoras (Liorad 2014)

Microorganismos: <i>Candida albicans</i>										
Variantes	Viabilidad (UFC/mL)									
	Meses			Años						
	3	6	9	1	2	3	4	5	6	7
A	$2,0 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$<10^5$	---	---	---
B	$1,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$<10^5$	---	---	---	---	---
C	$1,0 \times 10^7$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	---	---	---	---	---	---
D	$1,0 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$	$<10^5$	---	---	---	---	---
E	$1,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	

Variantes: A (leche descremada al 20 %), B (glicerol 20 %), C (sacarosa al 10 %), D (peptona 5 %), E (leche 10 %, sacarosa 5 %, glicerol 5 %).

Los ensayos de estabilidad genética mostraron un comportamiento típico de este microorganismo descrito en la literatura. La evaluación de la producción del tubo germinativo, estructura que identifica la especie *C. albicans*, se identificaron al microscopio (X10) como una extensión a partir de la célula de la levadura, semejante a las hifas, y sin constricción en su punto de origen. La cepa estudiada fue capaz de producir clamidiosporas, fue productora de tubo germinativo, creció a 45 °C, formó micelio y pseudomicelio, y dio ureasa negativa. Además mostró la capacidad para asimilar las sustancias carbonadas frente a la glucosa, xilosa, adonitol, galactosa, sorbitol, maltosa y trehalosa, y no utilizó el inositol, cellobiosa, lactosa, melecitosa, rafinosa.²¹⁻²⁴

DISCUSIÓN

Las características organolépticas de las pastillas liofilizadas y la rehidratación instantánea, son algunos aspectos que se persiguen al emplear el método de liofilización, por lo que no haber logrado una buena apariencia del liofilizado al emplear la sacarosa como sustancia lioprotectora permite plantear que la metodología propuesta (receta de liofilización y el lioprotector) no resultaron efectivo para la cepa en estudio.^{8,9}

La observación microscópica del cultivo demostró la presencia de cultivos puros. Las colonias observadas coincidieron con la morfología típica de la cepa de referencia en estudio. El hecho de que los microorganismos estén biológicamente puros es un aspecto fundamental a tener en cuenta para la conservación de las cepas microbiológica, por lo que deben realizarse ensayos apropiados para la detección de contaminantes.^{6,7,20}

En cuanto a los resultados de la viabilidad durante el tiempo de almacenamiento, una vez liofilizados los cultivos, no debe existir variación en su viabilidad. Es de gran importancia obtener un cultivo en que las propiedades permanezcan inalterables al someterlo a la liofilización. La disminución de los niveles de viabilidad de las variantes A, B, C y D puede deberse a que las paredes celulares de las levaduras son más frágiles que las paredes bacterianas, además de su tamaño superior al de las bacterias. Las condiciones de liofilización establecidas pueden haber propiciado la formación de grandes cristales de hielo que ocasionan, con más facilidad, daños en las estructuras celulares de estos microorganismos.⁹⁻¹¹

También puede deberse a que los lioprotectores empleados no fueron adecuados, para la mayoría de los aditivos empleados los mecanismos del efecto protector son poco conocidos. Por lo tanto no existe una formulación universal, pues depende de la especie biológica a conservar.¹¹ Es por ello que se plantea que para un microorganismo dado existen sólo uno o dos lioprotectores adecuados.¹²

En el caso de la variante E donde se obtuvieron los mejores resultados de viabilidad, permite plantear que el medio soporte utilizado para la liofilización ha brindado protección en la supervivencia a esta cepa durante el tiempo de estudio. Estos resultados coinciden con lo que plantean algunos autores de que en la actualidad está más extendido el empleo de mezclas de aditivos.¹⁰

Según la metodología convencional, la identificación primaria de toda especie de levadura comienza con la evaluación de criterios macroscópicos. Es común realizar la identificación de *C. albicans* mediante la técnica de tubo germinativo, una prueba simple, rápida y económica. La asimilación de azúcares, la termotolerancia a temperaturas entre 42 y 45 °C, todos estos análisis forman parte de un conjunto de ensayos que se realizan según la metodología micológica convencional, de conjunto con otros ensayos (producción de clamidosporas, formación del micelio y pseudomicelio) confirmaron la identidad de la cepa en estudio.²¹⁻²⁴

El cultivo liofilizado de levadura *Candida albicans* mostró durante todo el tiempo objeto de estudio para todas las variantes estudiadas mantener características de: cultivos puros y estables.

Los valores obtenidos de viabilidad durante todo el tiempo objeto de estudio al emplear la mezcla de lioprotectores permite inferir que resultó una buena opción para la conservación de este microorganismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prakash O, Shouche Y, Jangid K, Kostka JE. Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era [Internet]. Applied Microbiology and Biotechnology. 2013 Jan [citado 10 sept 2013]; 97(1):51-62. Available from: http://www.download.springer.com/static/pdf/834/art%253A10.1007%252Fs00253-012-4533-y.pdf?auth66=1416260459_d2b42904c093c13b5ac0b427d905f4be&ext=.pdf
2. Sly LI. Biodiversity and the Role of Microbial Resource Centres [Internet]. In: Proceedings Biodiversity and World Food Security Biodiversity And World Food Security: Nourishing The Planet And Its People" 30 August – 1 September, 2010. Canberra, Australia: Crawford Fund for International Agricultural Research; 2010 [citado 10 sept 2013]. Available from: <http://www.ageconsearch.umn.edu/bitstream/125250/2/Sly2010.pdf>
3. Weng Z. Conservación de microorganismos: importancia y retos [CD-Rom]. En: VII Taller sobre colecciones de cultivos microbianos. La Habana: Ediciones Finlay; 2010.
4. Del Puerto CA, Iglesias E, Morales T, Baños N, Nocedo MD, Carnota GY, et al. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. Rev Vaccimonitor. [Internet] 2009 [citado 10 sept 2013]; 18(1):20-4. Disponible en: <http://www.bvv.sld.cu/vaccimonitor/Vm2009/a4.pdf>
5. Weng Alemán Z, Díaz Rosa OE, Álvarez Molina I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? Rev Cub Hig Epidemiol [Internet]. 2005 Dic [citado 17 sept 2013]; 43(3). Disponible en: http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000300006&lng=es
6. García López MD, Fernández Uruburu F. La conservación de cepas microbianas, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) [Internet]. Valencia, España: Universidad de Valencia; 2008 [citado 17 sept 2013]. Disponible en: http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM30_12.pdf
7. Burguet N, Sierra N, Brito L. Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. Revista CENIC. Ciencias Biológicas [Internet]. 2012 sept-dic. [citado 17 sept 2013]; 43(3):151-4. Disponible en: <http://www.revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-3-2012-151-154.pdf>
8. Giono S, Arteaga RI. Recomendaciones generales para la liofilización de cultivos microbianos. Boletín FELACC: 2010(4):2-4.
9. Moreira T, Gutiérrez A, Delgado H. Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. Biotecnol Appl [Internet]. 1994 may-ago [citado 17 sept 2013]; 11(2):113-7. Disponible en: <http://www.elfossscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Appl/1994/11/2/p%20113%20-%20119%20.pdf>
10. Sotolongo J. Conservación de microorganismos por liofilización [CD-Rom]. En: V Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos. La Habana: Ediciones Finlay; 2006.

11. Iglesias E, Del Puerto CA, Martínez R, González M, Baños N, Simón B, et al. Establecimiento del cepario central del polo [CD-Rom]. En: VII Taller sobre colecciones de cultivos microbianos. La Habana: Ediciones Finlay; 2010.
 12. Iglesias E, Morales M, Morales R, Weng Z, Cabrera R, del puerto C, et al. Colecciones cubanas de cultivos microbianos y otros materiales biológicos [CD-Rom]. En: VI Taller de Colecciones de cultivos microbianos y otros materiales biológicos. La Habana: Ediciones Finlay; 2008.
 13. Ivano RV. The brazilian reference culture collection. Boletín FELACC. 2009(2):5-7.
 14. Smith D. Culture collections over the world. Int Microbiol. 2003;6(2):95-100.
 15. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. FEMS Microbiology Letters [Internet]. 2013[citado 17 sept 2013];339(1):1-9. Available from: <http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1574-6968.12034/full>
 16. American Type Culture Collection Technical Bulletin No.6. Reference strains: How many passages are too many? Reprinted from ATCC Connection [Internet]. 2003 Feb[citado 17 sept 2013];23(2):6-7. Available from: <http://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb06.ashx>
 17. Federación Mundial de Colecciones de Cultivo. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de Colecciones de cultivos de microorganismos [Internet].3rd ed. Traducción autorizada Comité Ejecutivo de WFCC. Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Microbiología; 2010 [citado 17 sept 2013]. Disponible en: http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa ol.pdf
 18. Chi Ramírez L. Control de los recursos microbiológicos empleados en la producción de medicamentos mediante la integración al sistema de gestión de calidad certificado por las normas ISO 9001:2000 concedido a Biocen 2010. En: VII Simposio De Recursos Genéticos Para América Latina Y El Caribe, SIRGEALC 2009. CHILE, 27 oct.-1ro nov. 2009. Santiago de Chile, Chile: INIA; 2009.
 19. United States Pharmacopeia Convention. United States Pharmacopeia 35 – National Formulary 30. Rockville MD; USA: USPC; 2012.
 20. Fernández P. Obtención y Aislamientos de cultivos puros. Capítulo 15. En: Manual de Microbiología General. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1983. p. 31-5.
 21. Dos Santos OG, Ribeiro Teixeira E, Baroni FA. An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida* spp. from human and animal sources. Rev Inst Med Trop S. Paulo [Internet]. 2006 Dec [citado 18 oct 2013];48(6):311-5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-4665200600060002&lng=en
<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-4665200600060002>
 22. Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Zayas Ruíz Y, Rodríguez Rodríguez A. Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado. Rev Cub Med Trop [Internet]. 2010 Abr [citado 18 oct 2013];62(1):66-81. Disponible en: http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000100008&lng=es
-

23. Moromi Nakata H, Dávila Nicho J. Morfotipo de colonias de cepas de *Candida* de pacientes atendidos en la clínica odontológica. Odontol. Sanmarquina [Internet]. 1998[citado 18 oct 2013]; 1(1):11-2. Disponible en:
http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/brevistas/odontologia/1998_n1/morfotipo.htm
24. Villarroel Rodríguez PJ, Santa Cruz Rodríguez AC. Identificación de especies de levaduras del género *Candida* aislados de exudados vaginales de pacientes en el Hospital Materno Germán Urquídi. Gac Med Bol [Internet] 2011[citado 18 oct 2013]; 34(2):84-6. Disponible en:
<http://www.dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3814340.pdf>

Recibido: 18 de noviembre de 2013.

Aprobado: 16 de mayo de 2014.

Nancy Burguet Lago. Laboratorios Liorad. Calle 27 A / 264 y 268 Reparto. San Agustín, La Lisa. La Habana, Cuba.

Correo electrónico: nburguet@liorad.aica.cu