

SISTEMA "KILLER" EN CEPAS DE CANDIDA ALBICANS. PARTE I.

Hortensia María Magaró, Marisa Susana Biasoli
& Blanca Julieta Corallini de Bracalenti.

Departamento de Microbiología (Area Micología).
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.
Universidad Nacional de Rosario.

Suipacha 531. Rosario (2000). Santa Fé República Argentina.

Palabras clave : Sistema "Killer", *Candida albicans*.

Key Words: Killer system, *Candida albicans*.

RESUMEN.

Se analizaron 94 (100%) cepas de levaduras de nuestra Micoteca pertenecientes principalmente a los géneros: *Candida* 64.89%; *Saccharomyces* 14%; *Rhodotorula* 5,31% y *Pichia* 4,25%.

De todas las cepas estudiadas *C. catenulata* resultó killer positiva frente a cepas de *C. albicans* sensibles, y también mostraron eficacia "killer" algunas cepas de *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *Hansenula anomala*, *C. utilis* y *Trigonopsis variabilis*, con diferentes porcentajes de actividad.

El objeto de esta comunicación es presentar los resultados de la búsqueda de un sistema "killer" adecuado que será posteriormente enfrentado a *C. albicans* y otras especies de este género aisladas de materiales clínicos que se procesan en nuestro laboratorio asistencial

SUMMARY.

[*Killer System in Candida albicans strains. Part I*]

Ninety four (100%) yeast colonies obtained from our culture collection were tested: *Candida* 64,89%; *Saccharomyces* 14%; *Rhodotorula* 5,31% and *Pichia* 4,25%.

Of all the yeasts tested, *Candida catenulata* proved to be a positive "killer" for sensitive *C. albicans* strains. Some strains of *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *Hansenula anomala*, *Candida utilis* and *Trigonopsis variabilis* also showed "killer" effectiveness with different degrees of activity.

The object of this short communication is to present the first results of the search for an appropriate "killer" system which will be later tested on *C. albicans* and *Candida* spp. isolated from material processed at our clinical laboratory.

INTRODUCCION.

En 1963, Bevan y Makower (1) describieron, por primera vez, que algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* producían una sustancia letal para otras cepas de la misma especie. Este efecto fue denominado fenómeno killer y la sustancia se llamó toxina killer. Desde entonces numerosos estudios se llevaron a cabo para determinar la distribución del fenómeno killer entre las levaduras, las modalidades de su acción y las propiedades fisiológicas y químicas de la toxina.

Las cepas killer de levaduras contienen una doble cadena de RNA (14), el cual codifica para una proteína extracelular (9). Esta proteína mata células sensibles por unión a la superficie de la célula.

La toxina killer induce la salida de adenosin trifosfato (ATP) (3) y de iones Potasio (K) (13), como también la inhibición de procesos macromoleculares en la última fase de muerte, donde el 70-80% de las células estaban muertas (2). Por esta razón se sospechó que los efectos observados fueron una consecuencia final más que un efecto primario de la toxina.

La toxina es lábil al calor, siendo estable aproximadamente a 22° C y activa solo dentro del rango de pH de 4.2-4.6. Existe un claro paralelismo entre la secreción de toxinas killer de levaduras y la producción de bacteriocinas. La producción de ambas está asociada con inmunidad específica y la toxicidad está restringida a tipos de células similares. Las cepas de levaduras killer, pueden ser calificadas como **cepas micocinogénicas** y sus toxinas, **micocinas**.

L. Polonelli y col. (11) propusieron un método simple de tipificación de cepas de *C. albicans* a través del sistema killer al enfrentar las cepas en estudio a nueve levaduras diferentes, con capacidad killer. Las cepas killer fueron seleccionadas probando su actividad sobre 100 cepas de *C. albicans*.

Los autores plantearon la posibilidad de que un sistema killer y/o sus toxinas purificadas, de acción sobre cepas de *C. albicans*, pueda ser utilizado como marcador epidemiológico en infecciones hospitalarias.

El objeto de esta comunicación es presentar los resultados de la búsqueda de un nuevo sistema killer que será posteriormente probado frente a *C. albicans* y otras especies del género aisladas de materiales clínicos que se procesan en nuestro laboratorio asistencial

MATERIALES Y METODOS.

Se trabajó con 94 cepas de levaduras de la Micoteca del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, comprendidas en los siguientes géneros y especies:

Brettanomyces bruxellensis 1
(Kufferath et van Laer (CMUR N° 176-74)

Candida albicans 26
(Robin) Berkhout
(CMUR N° 100-71, 101-71, 102-71, 103-71, 104-71, 106-71, 107-71, 108-71, 109-71, 110-71, 111-71, 112-71, 113-71, 114-71, 100-72, 101-72, 102-72, 104-72, 105-72, 100-73, 101-73, 100-74, 101-74, 102-74, 103-74, 104-74)

C. catenulata 4
(Diddens et Lodder
(CMUR N° 115-71, 116-71, 117-71, 118-71)

C. curiosa 1
(Komagata et Nakase (CMUR N° 122-74)

C. curvata 1
(Diddens et Lodder) Lodder et Kreger van Rij
(CMUR N° 119-71)

C. guilliermondii 3
(Castellani) Langeron et Guerra
(CMUR N° 107-74, 108-74, 101-75)

C. krusei 1
(Castellani) Berkhout (CMUR N° 109-74)

C. parapsilosis 1
(Ashford) Langeron et Talice (CMUR N° 111-74)

C. pulcherrima 2
(Lindner) Windisch
(CMUR N° 115-74 y FFBBA N°107)

C. kefir 2
(Beijerinck) van Uden et Buckley
(FFBBA N° 67, 254)

C. salmanticensis 1
(Santa María) van uden et Buckley

C. tropicalis 16
(Castellani) Berkhout
(CMUR N° 121-71, 122-71, 123-71, 124-71, 102-72, 111-72, 112-72, 113-72, 114-72, 115-72, y FFBBA N° 4, 87, 308, 12, 413 y 431)

C. utilis 2
(Henneberg) Lodder et Kreger van Rij
(CMUR N° 116-72, 161-74)

Torulaspota globosa 1
(Klöcker) van der Walt et Johannsen
(FFBBA N° 261)

Debaryomyces hansenii 1 (Zopf) Lodder et Kreger van Rij (FFBBA Nº 46)	Sporobolomyces salmonicolor 1 (Fischer et Brebe) Kluyver et van Neil (FFBBA Nº 92)
Saccharomycopsis fibuligera 1 (Lindner) Klöcker (FFBBA Nº 66)	Trichosporon beigelii 2 (CMUR Nº 103-70 y 103-73)
Geotrichum candidum 1 Link ex Fr (FFBBA Nº 84)	Trichosporon spp. 1 (CMUR Nº 102-73)
Hansenula anomala 1 (Hansen) H et P.Sydow (FFBBA Nº 264)	Trigonopsis variabilis 1 Schachner (FFBBA Nº 193)
Hansenula capsulata 1 Wickerham (FFBBA Nº 86)	Wickerhamia fluorescens 1 Soneda (FFBBA Nº 113)
Pichia membranaefaciens 3 (Hansen) (FFBBA Nº 94, 185 y 283)	Zygosaccharomyces bailii 1 (Lindner) Guilliermond (FFBBA Nº 19)
Pichia fermentans 1 Lodder (FFBBA Nº 101)	CMUR: Colección Micología Universidad Rosario FFBBA: Facultad Farmacia y Bioquímica Buenos Aires
Rhodotorula rubra 2 (Demme) Lodder (FFBBA 69 y CMUR 132-71)	De estas 94 cepas de diferentes géneros y especies de levaduras fueron seleccionadas 18 levaduras que mostraron efecto killer sobre 10 cepas de <i>C. albicans</i> provenientes de materiales clínicos e identificados según Kreger Van Rij (6). El medio de cultivo utilizado es el YEPD según Polonelli y col. (11). La realización de la prueba consistió en colocar 1 ml. de una suspensión en agua destilada de una cepa de <i>C. albicans</i> de 48 horas de incubación a 28º C. con una densidad óptica de 25% a 530 nm; en 20 ml. de medio agar YEPD. Se homogenizó con un Vortex y se colocó sobre una placa de Petri. Las levaduras killer fueron cultivadas previamente por 48 horas en caldo de Sabouraud Glucosa y estriadas sobre la placa de Petri conteniendo el agar YEPD inoculado con la cepa en estudio. Las placas fueron incubadas a 25º C. por 72 horas. Después de este tiempo fueron leídos los resultados. (Figura 1)
Rhodotorula spp. 1 (CMUR Nº 133-71)	El efecto Killer se consideró positivo cuando apareció una zona clara de inhibición o una región de células coloreadas de azul, o ambas, alrededor de la levadura killer estriada. Un resultado negativo fue considerado, cuando ninguno de los dos efectos pudo ser observado.
Saccharomyces cerevisiae 7 Meyen ex Hansen (FFBBA Nº 10 11, 415, 12, 13, 284 y 206)	
Zygosaccharomyces bisporus 1 Naga Nishi (FFBBA Nº 106)	
Saccharomyces kluyveri 2 Phaff, Miller et Shifrine (FFBBA Nº 111 y 112)	
Kluyveromyces marxianus 2 (Hansen) Van der Walt (FFBBA Nº 127 y 207)	
Torulasporea delbrueckii 1 (Lindner) (FFBBA Nº 114)	

CUADRO Nº 1:
Actividad killer de diferentes géneros y especies de levaduras frente a diez cepas de *C.albicans*.

C. albicans Levaduras con efecto killer (materiales clínicos)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	% de actividad killer
C. albicans (CMUR Nº 100-73)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
C. albicans (CMUR 101-73)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
C. albicans (CMUR 100-74)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
C. albicans (CMUR 103-74)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
C. albicans (CMUR 104-74)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
C. guilliermondii (CMUR 108-74)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
C. catenulata (CMUR Nº 115-71)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Hansenula anomala (FFBBA Nº 264)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
C. utilis (CMUR 161-74)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	90
Trigonopsis variabilis (FFBBA 193)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	90
C. pulcherrima (FFBBA 107)	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	60
C. parapsilosis (CMUR 111-74)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	50
C. curiosa (CMUR 122-74)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	30
Hansenula capsulata (FFBBA 86)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	20
Pichia membranaefaciens (FFBBA 94)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Pichia fermentans (FFBBA 101)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Rhodotorula rubra (FFBA 69)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Saccharomyces kluyveri (FFBBA 111)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10

+ : indica efecto killer positivo
- : indica efecto killer negativo

RESULTADOS.

En el Cuadro Nº 1 se aprecia la actividad killer de los géneros y especies de levaduras aisladas y sus respectivos porcentajes de actividad frente a 10 cepas de *C. albicans* aisladas de diversas lesiones de enfermos

Se observa que diferentes cepas de *C. albicans* presentan efecto killer sobre *C. albicans* sensibles, lo mismo que *C. catenulata*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. guilliermondii*, *Hansenula anomala*, *Candida utilis* y *Trigonopsis variabilis*.

De todas la levaduras estudiadas, éstas son las que presentan mayor porcentaje de efecto killer, a diferencia de las levaduras de los géneros: *Pichia*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, etc., que mostraron efecto tóxico variable sobre las cepas de *C. albicans* (Cuadro Nº 1). Posteriormente se comprobó la actividad killer de las capas productoras sobre 30 cepas diferentes de *C. albicans* aisladas de materiales clínicos, manteniéndose los mismos porcentajes de actividad que los indicados en el Cuadro Nº 1.

DISCUSION Y CONCLUSION

Todas las cepas de *C. albicans* aisladas resultaron ser sensibles al menos a una de las levaduras killer, coincidiendo con lo observado por Polonelli y col. (11).

Se sabe que cepas productoras de toxinas killer han sido encontradas no sólo en *Saccharomyces cerevisiae*, sino también en una amplia variedad de otros géneros y especies, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, otros *Saccharomyces* (excluyendo *S. cerevisiae*) y *Ustilago* (4, 5, 7, 8, 10, 12,) los cuales están comprendidos en su mayoría en los 14 géneros y especies analizados. En nuestro caso el mayor efecto killer correspondió a los géneros *Candida*, *Hansenula*, y *Trigonopsis*.

Las levaduras seleccionadas por poseer actividad killer son: *C. albicans* (cepas:100-73, 101-73, 100-74, 103-74, 104-74) 100% de actividad; *C. guilliermondii* (108-74) y *C. catenulata* (115-71) 100% de actividad; *Hansenula anomala* (264) 100% de actividad; *C. utilis* (161-74) 90% de actividad; *Trigonopsis variabilis* (193) 90% de actividad; *C. pulcherrima* (107) 60% de actividad y *C. parapsilosis* (111-74) 50% de actividad.

REFERENCIAS

1. Bevan, E.A. & Makower, M. (1963). The Physiological Basis of the killer Character in Yeast. Genetic Today. Proceedings International Congresses on Genetic, XIth, Vol.1, 202-203.
2. Bussey, H. (1972), Effects of yeast killer factors on sensitive cells. Nature, London, New Biology, 235, 73-75.
3. Bussey, H. & Sherman, D. (1973). Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. Biochemistry and Biophysics Acta, 298,868, 875'
4. Bussey, H. & Skipper, N. (1975). Membrane-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. Journal of Bacteriology, 124, 476-483.
5. Kandell, J.S. & Stern, T.A. (1979). Killer phenomenon in pathogenic yeasts. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 15, 568-571.
6. Kreger van Rij N.J.W. (1984). The Yeasts. A Taxonomic Study. 3º edic. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

7. Maule, A.P. & Thomas, P.D. (1973). Strains of Yeast Lethal to Brewery Yeasts. *Journal Institut Brew*, London, 79, 137-141.
8. Naumov, G.I. & Naumova, T.I. (1973) Comparative genetics of yeasts. XIII. Comparative study of killer strains of *Saccharomyces* from different collections. *Genetika*, 9, 140-145.
9. Palfree, R.G.E. & Bussey, H. (1979). Yeast killer toxin: Purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 93, 487-493.
10. Philliskir, K.G. & Young, T.W. (1975). The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie van Leeuwenhoek*, 41, 147-151.
11. Polonelli, L.; Archibusacci, C.; Sestito, M. & Morace, G. (1983). Killer System: a Simple Method for Differentiating *Candida albicans* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 17, N°5, 774-780.
12. Puhalla, J.E. (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrains inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics*, 60, 461-474.
13. Skipper, N. & Bussey, H. (1977). Mode of action of yeast toxins: Energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. *Journal of Bacteriology*, 129, 668-677.
14. Wickner, R.B. (1979). The killer double-stranded RNA plasmids of yeast. *Plasmid*, 2, 303-322.