

BIOTIPOS KILLER DEL GENERO *Candida* AISLADOS DE RATONES

(Killer biotypes of the genus *Candida* isolated from mice.)

Hortensia M. Magaro R.¹ & María E. A. Tosello G.²

Dpto de Microbiología ¹Arca Parasitología, ² CEREMIC.
Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR. Suipacha 531. Rosario 2000.

Palabras clave: Biotipos, toxinas killer, *Candida*, ratones

Key words: Killer toxins, biotypes, *Candida*, mice

RESUMEN

Se determinó la potencialidad killer de diversos tipos de levaduras del género *Candida* aisladas del tracto gastrointestinal de 40 ratones Rockland adultos sometidos a una dieta hiperglúcida, compuesta de harina de Graham (49%), sacarosa (49%) y NaCl (2%). Las levaduras se determinaron según la técnica de Rippon y se identificaron mediante las claves de Kreger Van Rij. Para establecer su sensibilidad y potencialidad, se aplicó el Sistema Killer Italiano (SKI), según la técnica de Polonelli et al.

En el tracto gastrointestinal de los ratones, las especies de *Candida* más aisladas fueron *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. El biotipo killer en el 97,5% de los casos fue el 111 y el 65% de las levaduras tuvieron 100% de actividad killer.

INTRODUCCION

El ecosistema gastrointestinal humano es abierto, integrado, con unidades interactivas conteniendo muchos habitat microbianos, mientras en el animal adulto normal, cada uno de estos está colonizado por una comunidad microbiana autóctona, formada por bacterias, protozoos y ocasionalmente levaduras. Cada una de éstas ocupa su nicho contribuyendo en alguna manera a la economía de todo el ecosistema.

El tracto gastrointestinal de los ratones sometidos a una dieta equilibrada alberga bacterias y protozoos, no conviviendo generalmente con ellos las levaduras. El estado de equilibrio de ese ecosistema se ve alterado cuando entran en juego factores diversos (dietas, drogas, etc.). Si sus alimentos son ricos en hidratos de carbono, desarrollan diversas especies de levaduras (1). Algunas de ellas tienen la capacidad de actuar sobre otras levaduras y microorganismos relacionados mediante la producción de

SUMMARY

The objectives of this work were: to study the killer types of yeasts isolated from the gastrointestinal tract of mice fed on a hyperglucidic diet, to determine the yeast killer potentiativity facing to themselves

Forty Rockland adult mice were treated. They were fed on a diet composed of Graham flour (49%), sucrose (49%) and NaCl (2%).

The sensitivity and potentiality study of the analyzed yeasts when confronted with the Italian Killer System (SKI) was performed according to Polonelli et al.

In the gastrointestinal tract of mice, the species of *Candida* that showed the highest isolation were *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. The most frequent killer type was 111 (97,5%), and 65% of yeasts presents 100% the killer activity.

sustancias letales o toxinas killer.

La producción por las levaduras de exotoxinas con actividad antimicrobiana, es un fenómeno relativamente común en microorganismos susceptibles y es mediada por receptores específicos de la pared celular (2, 3). Generalmente corresponden a proteínas o glicoproteínas, que son capaces de matar células susceptibles pertenecientes a la misma especie o especies relacionadas y han sido definidas como toxinas killer. Las levaduras killer son inmunes a la actividad de sus propias toxinas killer y este efecto puede representar un modelo de competición biológica, que se manifiesta de manera similar a las bacteriocinas entre las bacterias.

El efecto killer es mediado por la presencia de receptores celulares específicos para las toxinas y por la ausencia de un sistema de inmunidad específica. Las toxinas killer son capaces de matar levaduras no killer, así como levaduras de otros tipos killer, permaneciendo inmunes para su propia toxina y para la producida por cepas del mismo

grupo killer, pero son susceptibles a otras toxinas killer (4).

El fenotipo killer de las levaduras que se expresa diferencialmente sobre cepas sensibles, ha sido utilizado en estudios epidemiológicos, como un método flexible y seguro de biotipado de numerosas especies de microorganismos eucariontes y procariontes (5).

Nuestro objetivo, fue estudiar los tipos killer del tracto gastrointestinal de ratones sometidos a una dieta hiperglúcida, determinando su potencialidad al enfrentarlas entre sí.

MATERIALES Y METODOS

Se trataron 40 ratones Rockland adultos a los que se les suministró una dieta compuesta de: harina de Graham (49%), sacarosa (49%) y NaCl (2%).

Luego de 15 días de tratamiento con dieta hiperglúcida, se sacrificó a los ratones, seccionándoles el intestino en cuatro partes: primera parte del intestino delgado (aproximadamente 10 cm), segunda parte de intestino delgado (15 cm), ciego y recto.

Se extrajo la materia fecal resuspendiéndola en 1 ml de solución fisiológica estéril. Se realizaron exámenes directos al fresco y con colorante Gueguén para la observación de levaduras. Posteriormente se sembró en medios de Sabouraud glucosa y Sabouraud glucosa +Caf y se incubaron durante una semana a 28°C.

Las levaduras fueron estudiadas por: producción de clamidoconidios en agar harina de maíz, auxonograma de hidratos de carbono y sustancias nitrogenadas, zimograma de hidratos de carbono, según técnica de Rippon y producción de ureasa en medio de Christensen (6).

Para la identificación de los géneros y especies de levaduras se utilizaron las claves de Kreger Van Rij (7).

La sensibilidad y potencialidad killer de las levaduras enfrentadas entre sí, se basó en el Sistema Killer Italiano (SKI), según la técnica de Polonelli y col (8).

Se probó la sensibilidad de cada una de las levaduras con todas las levaduras aisladas del tracto gastrointestinal de los ratones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se aislaron 14 especies de levaduras desde las diferentes secciones del tracto gastrointestinal de los ratones sometidos a dieta hiperglúcida; las especies de *Candida* más aisladas fueron *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. El biotipo killer, en el 97,5% de los casos fue el III. Una de las cepas de *C. parapsilosis* presentó un tipo killer 212 (Tabla. 1).

El (65%) de las levaduras aisladas tuvieron 100%

de actividad killer, representadas mayoritariamente por 10

Tabla N°1.

Tipos killer de *Candida* spp. aisladas del tracto gastrointestinal de ratones.

Especie	Nº aislamiento	Tipos killer
<i>C. tropicalis</i>	12	111
<i>C. parapsilosis</i>	10	111
<i>C. azyma</i>	3	111
<i>C. maltosa</i>	2	111
<i>C. sake</i>	2	111
<i>C. quercitrusa</i>	2	111
<i>C. buinensis</i>	1	111
<i>C. catenulata</i>	1	111
<i>C. colliculosa</i>	1	111
<i>C. famata</i>	1	111
<i>C. krusei</i>	1	111
<i>C. pseudointermedia</i>	1	111
<i>C. quercuum</i>	1	111
<i>C. solani</i>	1	111
<i>C. parapsilosis</i>	1	212

Tabla N°2.

Potencialidad killer de *Candida* spp. del tracto gastrointestinal de ratones enfrentadas entre sí.

Nº aislam.	%	Especies	actividad killer(%)
26	65	10 <i>C. parapsilosis</i> 6 <i>C. tropicalis</i> 2 <i>C. quercitrusa</i> 1 <i>C. azyma</i> 1 <i>C. colliculosa</i> 1 <i>C. famata</i> 1 <i>C. maltosa</i> 1 <i>C. pseudointermedia</i> 1 <i>C. quercuum</i> 1 <i>C. sake</i> 1 <i>C. solani</i>	100
3	7,5	2 <i>C. azyma</i> 1 <i>C. krusei</i>	97
3	7,5	2 <i>C. tropicalis</i> 1 <i>C. parapsilosis</i>	94
5	12,5	4 <i>C. tropicalis</i> 1 <i>C. maltosa</i>	91
1	2,5	1 <i>C. buinensis</i>	86
1	2,5	1 <i>C. catenulata</i>	
1	2,5	1 <i>C. sake</i>	65

cepas de *C. parapsilosis* y 6 de *C. tropicalis*, y un 15 % con actividad cercana al 100% (Tabla. 2).

A pesar que existe cierta semejanza entre las principales especies de levaduras aisladas del tracto gastrointestinal del ratón y los humanos (9), destacamos la ausencia de *C.albicans*, la cual representa el principal taxon en éstos últimos (31%) y su tipo killer más frecuente (67,1%), el 111 (9).

El efecto killer, ha sido ampliamente estudiado entre diferentes géneros y especies de levaduras, bacterias y otros microorganismos eucariontes (10, 11).

La naturaleza del fenómeno killer, implica un rol potencial para la competencia, considerando que las toxinas killer de levaduras pueden prevenir el acceso de microorganismos antagónicos a las fuentes, pudiendo constituir una ventaja selectiva durante las fases tempranas del crecimiento microbiano (4). Las toxinas killer de levaduras son producidas en forma óptima durante el crecimiento celular y son activas contra células en el mismo estado cuando los nutrientes están disponibles y el pH es bajo.

La densidad de la población de levaduras susceptibles, creciendo en presencia de cepas killer, es mucho más baja que si la misma cepa susceptible de levadura crece en asociación con la cepa no killer (12). La probabilidad de que una toxina killer de levadura pueda matar a otras levaduras susceptibles, podría también depender de las características ecológicas, tales como la región, y el habitat del cual ambas cepas de levaduras fueron colectadas (4). Esto podría explicar las diferencias encontradas en el tracto gastrointestinal del modelo animal. Por otra parte, en el tracto gastrointestinal de los ratones, observamos que la mayoría de las levaduras, tienen el 100% de actividad killer, lo que indicaría un mayor poder patógeno, tal como lo describió Morace *et al.*, (13). Asimismo, no habría variación de cepas dentro de las especies, excepto para una cepa de *C.parapsilosis*.

REFERENCIAS

- 1.- Magaró, H.M. & Bracalenti, B.J.C.de (1985). Interrelaciones entre protozoarios y levaduras intestinales de ratón. Boletín Chileno de Parasitología. 40:7-13
- 2.- Polonelli, L. & Morace, G. (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. J.Clin. Microbiol. 24:866-869
- 3.- Polonelli, L.; Conti, S.; Gerioni, M.; Magliani, W.; Morace, G.; Chezzi, C. (1991). Interfaces of the yeast killer phenomenon. Crit. Rev.Microbiol.18:47-87
- 4.- Magliani, W.; Conti, S.; Gerioni, M.; Bertolotti, D. and Polonelli, L.(1997). Yeast killer system. Clin.Microbiol. Rev.10:369-400
- 5.- Polonelli, L.; Conti, S.; Gerloni, M.; Menozzi, M.G.; Cantelli, C.; Morace, G. (1992) Potenzialità del fenómeno killer, dei lieviti. Rev. Iberoam. Micol. 9:23-27
- 6.- Rippon, J. (1982). Medical Mycology. 2° Ed. Philadelphia. USA. Saunders Company, pp. 774-775
- 7.- Kreger- Van Rij, N.J.W. (1984). The yeast. A Taxonomy study. 3° Ed. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.
- 8.- Polonelli, L.; Archibusacci, C.; Sestito, M.; Morace, G. (1983). Killer System: A simple method for differentiating *Candida albicans* strains. J.Clin.Microbiol. 17:774-780
- 9.- Magaró, H.M.; Biasoli, M.S.; Thomas, C.E.; Echenique, C.G.; Tosello, M.E.; Bracalenti, B.J.C. de.(1993). Aspectos del ecosistema gastrointestinal humano y levaduras killer. Rev. Iberoam. Micol. 10:47-50
- 10.- Polonelli, L.& Morace, J. (1986). Reevaluation of the Yeasts killer Phenomenon. J. Clin.Microbiol. 24:866-869
- 11 - Provost, F; Polonelli, L.; Conti, S.; Fisticaro, P; Gerioni, M.; Boiron, P. (1995). Use of Yeast Killer System to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. J. Clin.Microbiol. 33:8-10
- 12- Gantén, P.F. & Starmer, W.F. (1992). Killer factor as a mechanism of interference competition in yeast associated with cacti. Ecology. 73:54-67
- 13.- Morace, G., Archibusacci, C.; Sestito, M.; Polonelli, L.(1984). Strain differentiation of pathogenic yeasts by the killer system. Mycopathol. 84:81-85