

Identificación rápida y sensibilidad a toxinas *killer* de levaduras aisladas de micosis no sistémicas

M. P. SANGORRÍN^{1,3}, C. A. LOPES^{1,2,3}, A. RIVERO¹, A. C. CABALLERO^{1*}

¹Departamento de Química, Laboratorio de Microbiología y Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400 (8300) Neuquén, Argentina; ²Departamento de Biología Aplicada, Laboratorio de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. Ruta 151, Km 12,5 Cinco Saltos, Río Negro, Argentina; ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET)

*Correspondencia. E-mail: acaballe@uncoma.edu.ar

RESUMEN

La identificación rápida y segura de los agentes etiológicos y el desarrollo de nuevos antifúngicos con blancos de acción más específicos resultarán en tratamientos de las micosis más efectivos y menos lesivos. Mediante un método molecular rápido (ITS1-5.8S ADN_r-ITS2 PCR-RFLP) se identificaron 53 aislamientos de levaduras provenientes de infecciones no sistémicas registradas en hospitales públicos de la ciudad de Neuquén y en un centro oftalmológico de Buenos Aires durante el año 2005. Adicionalmente y utilizando el método de inhibición del crecimiento en placa, se evaluó la sensibilidad de estas levaduras a toxinas *killer* producidas por levaduras indígenas de la Patagonia y por cepas de referencia. Ocho especies de levaduras fueron identificadas entre los aislamientos clínicos: *Candida albicans* (52%), *Candida parapsilosis* (17%), *Candida tropicalis* (10%), *Candida krusei* (5%), *Candida glabrata* (4%), *Candida guilliermondii* (4%), *Kluyveromyces lactis* (4%) y *Saccharomyces cerevisiae* (4%). El 69% de los aislamientos de la especie mayoritaria, *C. albicans*, se relacionó con infecciones vaginales. Por otra parte, el 61% de las levaduras provenientes de infecciones oculares correspondió a la especie *C. parapsilosis*. En las condiciones de ensayo, las toxinas producidas por las levaduras *killer* indígenas DVMais5 y HCMeiss5 pertenecientes a las especies *Pichia anomala* y *P. kluyveri*, respectivamente, exhibieron el mayor espectro de acción sobre las levaduras aisladas de materiales clínicos.

Palabras claves: identificación, levaduras, micosis, ITS-RFLP, toxinas *killer*

ABSTRACT

Rapid identification and susceptibility to killer toxins of yeasts isolated from non-systemic mycoses. The use of quick and reliable yeast identification methods, as well as the development of new antifungal agents with more specific targets, will enable a more efficient treatment of mycoses. In the present work, a total of 53 clinical isolates obtained from non-systemic infections in Neuquén Hospitals and an ophthalmologic clinic in Buenos Aires during 2005, were identified by means of a rapid molecular method (ITS1-5.8S ADN_r-ITS2 PCR-RFLP). Additionally, the killer susceptibility of the isolates was tested against reference and indigenous killer yeasts on plate tests. Eight yeast species were identified among the clinical isolates: *Candida albicans* (52%), *Candida parapsilosis* (17%), *Candida tropicalis* (10%), *Candida krusei* (5%), *Candida glabrata* (4%), *Candida guilliermondii* (4%), *Kluyveromyces lactis* (4%) and *Saccharomyces cerevisiae* (4%). Sixty-nine percent of the isolates corresponding to the predominant species (*C. albicans*) were related to vaginal infections. On the other hand, 61% of the yeasts associated with ocular infections were identified as *C. parapsilosis*. Two indigenous killer isolates DVMais5 and HCMeiss5, belonging to *Pichia anomala* and *P. kluyveri* respectively, exhibited the broadest killer spectrum against clinical isolates.

Key words: yeast identification, yeast, mycoses, ITS-RFLP, killer toxins

INTRODUCCIÓN

El potencial patogénico de las levaduras varía considerablemente entre sus diferentes géneros, y se considera a *Candida* como el más relevante. Este género abarca más de 160 especies, 18 de las cuales se han descrito como causantes de manifestaciones clínicas (18, 26). Dentro de éstas, *Candida albicans* es la especie observada con mayor frecuencia (70% de los casos), principalmente en infecciones de tipo superficial como vaginitis, onicomycosis y dermatomycosis (9, 28), seguida por

Candida tropicalis y *Candida parapsilosis* (14, 15). Por otra parte y aun cuando las infecciones fúngicas conjuntivales se han considerado cuadros clínicos poco frecuentes, en los últimos años el uso de tecnologías láser para la corrección de problemas de la visión y el tipo de tratamiento previo que ellas conllevan han aumentado de manera significativa la frecuencia de aparición de infecciones oftalmológicas causadas por levaduras. Recientemente se han comunicado casos clínicos de conjuntivitis y, sobre todo, de queratitis causados por *C. albicans* y *C. parapsilosis* (16).

Los fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de las micosis son escasos y poco selectivos, con blancos de acción involucrados en procesos metabólicos comunes a todas las células eucariontes (7, 17). Este hecho, y las consecuencias clínicas del desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de ciertas especies de levaduras (21, 26), generan la necesidad de buscar nuevos compuestos que presenten ventajas comparativas apreciables frente a los existentes en el tratamiento de las micosis humanas.

En este contexto, los constituyentes de la pared celular, ausente en células de mamíferos, emergen como sitios de acción atractivos para el desarrollo de antimicóticos más selectivos (11). La búsqueda o el diseño de nuevos antimicóticos se ha orientado entonces hacia moléculas que interfieren en la síntesis de los constituyentes de la pared celular de hongos o que requieren de receptores específicos como un paso obligado para ejercer su acción tóxica. Dentro de este último grupo aparecen las toxinas *killer* producidas por levaduras (31). Estas toxinas, de naturaleza proteica y con actividad demostrada contra un gran número de patógenos humanos, tanto de origen fúngico como bacteriano (2, 3, 12), son producidas por distintas especies de levaduras procedentes de los ambientes más diversos (1, 23).

Se han caracterizado diferentes tipos de toxinas, las que se diferencian por su inmunidad cruzada y por sus mecanismos de acción (24, 31). No obstante e independientemente del tipo al que pertenecen y del mecanismo por el que ejercen su acción, todas las toxinas *killer* descritas hasta el presente necesitan unirse a receptores específicos de la pared celular de sus células blanco para ejercer su acción biológica: muerte o detención del ciclo celular de la población sensible (25).

Por otra parte, los métodos de rutina utilizados mayoritariamente en los laboratorios de análisis clínicos para la identificación de levaduras no permiten identificar de manera segura la especie responsable de la micosis (4, 5). Se emplean métodos de identificación más seguros sólo en los casos de falla terapéutica o de infecciones recidivantes o crónicas, y están limitados a laboratorios especializados o de referencia (10). El desarrollo de métodos de identificación taxonómica sencillos y seguros (6, 15), con posibilidades ciertas de ser implementados en todo tipo de laboratorios, redundará en tratamientos más adecuados y efectivos de las micosis humanas y disminuirá la probabilidad de fracasos terapéuticos, de consecuencias clínicas muchas veces graves.

Con el objetivo de responder a estos requerimientos y de identificar nuevas variantes de toxinas *killer* con potencial aplicación en el control de estos patógenos oportunistas, se ensayó un método molecular rápido y seguro, ampliamente utilizado en microbiología enológica, para identificar levaduras aisladas de infecciones no sistémicas. Asimismo, se evaluó la sensibilidad de estos

aislamientos frente a diferentes levaduras de referencia y a levaduras indígenas de la Patagonia productoras de toxinas *killer*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Levaduras asociadas a micosis no sistémicas

Los 53 aislamientos de levaduras provenientes de micosis no sistémicas utilizados en este trabajo –32 asociados a infecciones vaginales, 2 a amigdalitis, 3 a dermatitis, 3 a onixis y 13 a infecciones oculares, conjuntivitis y queratitis– fueron remitidos a nuestro laboratorio desde los Hospitales Públicos Castro Rendón y Heller, de la ciudad de Neuquén, y desde un centro privado de oftalmología de la Ciudad de Buenos Aires durante el año 2005. Sólo se aceptó un aislamiento por paciente.

Levaduras de referencia

Las cepas utilizadas como control en la identificación de las levaduras fueron: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 200918, *Candida guilliermondii* ATCC 46036, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Kluyveromyces lactis* ATCC 56498 y *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 18824.

Las levaduras *killer* de referencia fueron: *S. cerevisiae* YAT 679 (K_1), *S. cerevisiae* NCYC 738 (K_2), *S. cerevisiae* NCYC 761 (K_3), *C. glabrata* NCYC 388 (K_4), *Pichia anomala* NCYC 434 (K_5), *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 (K_6), *Candida valida* NCYC 327 (K_7), *P. anomala* NCYC 435 (K_8), *Williopsis saturnus* var. *mrakii* NCYC 500 (K_9) y *K. lactis* var. *drosophilum* NCYC 575 (K_{10}). ATCC: American Type Culture Collection; NCYC: National Collection of Yeast Cultures.

Levaduras *killer* indígenas

Cuarenta y seis levaduras de origen enológico indígenas de la región del Comahue, norpatagonia argentina, se seleccionaron para este trabajo por su capacidad de producir toxinas *killer* frente a cepas de colección sensibles en ensayos previos (22). La identidad y el origen de estas levaduras *killer* se presentan en la Tabla 1.

Identificación de levaduras

La identificación taxonómica de las levaduras provenientes de aislamientos clínicos se realizó por análisis del polimorfismo en los tamaños de los fragmentos obtenidos por restricción con endonucleasas específicas de la región génica ITS1-ADNr 5.8S-ITS2, previamente amplificada por PCR (ITS1-ADNr 5.8S-ITS2 PCR/RFLP).

La amplificación de la región génica se realizó en un termociclador PTC-150 Minicycler (MJ Research Incorporated) utilizando los cebadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGC GG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), previamente descritos por White y colaboradores (30). Cada colonia aislada se picó con una aguja estéril y se resuspendió en 50 μ l de la mezcla de amplificación que contenía 2 μ M de cada cebador; 0,1 mM de desoxinucleótidos y solución reguladora Tris-ClH 10 mM pH=9. Luego de un primer ciclo de 15 min a 95 °C, se adicionó a la mezcla 1 U de *Taq* ADN polimerasa. Los parámetros del termociclador se fijaron conforme con lo descrito por Estevez-Zarzo y colaboradores (8). Los fragmentos de ADN amplificados (0,5 μ g) se digirieron con las endonucleasas de restricción *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI*, de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Los productos obtenidos de la amplificación y de la restricción de los amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,4% y 3%, respectivamente. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante (100 V). Los geles se revelaron por tinción con bromuro de etidio (5 μ g/ml) y exposi-

Tabla 1. Identidad y origen de las levaduras *killer* indígenas de la región norpatagónica

Nº	Especie	Aislamiento (código) ⁽¹⁾
1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	A2.99/5
2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	HC.Mais9
3	<i>H. uvarum</i>	HC.Maiss19
4	<i>H. uvarum</i>	HC.E10
5	<i>H. uvarum</i>	HC.Maiss9
6	<i>H. uvarum</i>	HC.Mais14
7	<i>H. uvarum</i>	D.17
8	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	TPi.10
9	<i>M. pulcherrima</i>	TPi.17
10	<i>M. pulcherrima</i>	TPi.19
11	<i>M. pulcherrima</i>	TP10.2
12	<i>M. pulcherrima</i>	TP10.4
13	<i>M. pulcherrima</i>	TP10.10
14	<i>M. pulcherrima</i>	HC.Maiss18
15	<i>Pichia anomala</i>	DV.Mais5
16	<i>P. anomala</i>	DV.Mais10
17	<i>P. anomala</i>	DV.Mais18
18	<i>P. anomala</i>	DV.Mais19
19	<i>Pichia kluyveri</i>	HC.Meiss5
20	<i>P. kluyveri</i>	HC.Meiss6
21	<i>P. kluyveri</i>	HC.Mais20
22	<i>P. kluyveri</i>	Rp.13
23	<i>P. kluyveri</i>	Rp.14
24	<i>P. kluyveri</i>	D.1
25	<i>P. kluyveri</i>	D.8
26	<i>Rhodotorula glutinis</i>	HC.Ma2i3
27	<i>R. glutinis</i>	HC.Ma2i13
28	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DV.Mam19
29	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2m 11
30	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2m 12
31	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2m 14
32	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2m 15
33	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Maiss17
34	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2i 14
35	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2i 1
36	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2i 11
37	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2i 12
38	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2i 19
39	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2i 4
40	<i>S. cerevisiae</i>	HC.Ma2i 7
41	<i>S. cerevisiae</i>	A2.99/1
42	<i>S. cerevisiae</i>	EP.E28
43	<i>S. cerevisiae</i>	MMF9
44	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	EP.E7
45	<i>T. delbrueckii</i>	HC.Meiss17
46	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	HC.Meis16

⁽¹⁾ DV, HC y EP: bodegas de origen. R y D: sidreras de origen. A2.99: uvas Merlot vendimia 1999. TPi: mosto Trusseau inicial; TP10: mosto Trusseau 10°Bmé; MMF: mosto Malbec final; Mais: mosto Malbec inicial sulfitado; Maiss: mosto Malbec inicial no sulfitado; Mams: mosto Malbec medio sulfitado. Ma2i: mosto Malbec re-inoculado. Meis: mosto Merlot inicial sulfitado; Meiss: mosto Merlot inicial no sulfitado; p: mosto de sidra de pera; E: equipamiento de bodega. Los números arábigos indican el orden correlativo de los aislamientos dentro de cada serie.

ción a luz ultravioleta (UV). Como marcador de peso molecular se utilizó una escala de fragmentos de 100 pb de ácido desoxirribonucleico (ADN). La identificación de las levaduras se realizó comparando los tamaños de los amplificadores y de los fragmentos de restricción obtenidos experimentalmente con aquellos reportados en la base de datos www.yeast-id.com para cepas tipo de colección, algunas de las cuales se incluyeron en el trabajo con el fin de corroborar la reproducibilidad del método.

Adicionalmente, la identificación taxonómica se confirmó por métodos convencionales utilizando las pruebas y claves propuestas por Kurtzman y Fell (13), las que incluyeron: 1. morfología de la célula vegetativa y de la colonia y características de la reproducción vegetativa (medio YM agar); 2. características de la reproducción sexual (esporulación en agar acetato, McClary); 3. características del crecimiento en medio líquido (caldo YM); 4. fermentación de compuestos carbonados (medio basal: 0,45% p/v extracto de levadura y 0,75% p/v peptona, adicionado con la fuente carbonada a una concentración final del 2% p/v de C); 5. asimilación de compuestos carbonados (medio YNB agar adicionado con 1% p/v de fuente carbonada); 6. asimilación de compuestos nitrogenados (medio YCB agar adicionado con la fuente nitrogenada); 7. crecimiento en medio libre de vitaminas; y 8. crecimiento a distintas temperaturas (GPY agar: glucosa 4% p/v.; peptona 0,5% p/v; extracto de levadura 0,5% p/v y agar 2% p/v; pH 5,5; temperaturas ensayadas 25 °C, 37 °C y 40 °C).

En todas las pruebas se utilizaron cultivos jóvenes (desarrollados en GPY líquido a 25 °C durante 16-24 h con agitación) y, excepto en la prueba de crecimiento a distintas temperaturas, todas las incubaciones se realizaron a 25 °C, con observaciones diarias durante 7 a 10 días (salvo en la prueba de morfología, que se observó a las 48 h). En las pruebas de fermentación se utilizó D-glucosa, y de resultar esta prueba positiva, se ensayaron D-galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa y rafinosa. En las pruebas de asimilación de compuestos carbonados se ensayaron 37 compuestos diferentes, D-glucosa (control positivo), D-galactosa, L-sorbose, celobiosa, lactosa, maltosa, melibiosa, sacarosa, α,α -trealosa, melezitosa, rafinosa, inulina, almidón soluble, D-xilosa, D-ribose, L y D-arabinosa, L-ramnosa, glicerol, meso-eritritol, ribitol, xilitol, L-arabinitol, D-glucitol, D-manitol, galactitol, myo-inositol, metanol, etanol, 2-ceto-D-gluconato, ácido DL-láctico, ácido succínico, ácido cítrico, α -metil-D-glucósido, salicina, arbutina y D-glucosamina, y en las de asimilación de compuestos nitrogenados, cinco: sulfato de amonio 0,05% p/v (control positivo); nitrato de potasio 0,078% p/v; nitrito de sodio 0,02% p/v; etilamina 0,06% p/v; y L-lisina 0,05% p/v. En los controles negativos las fuentes carbonadas o nitrogenadas se reemplazaron por agua destilada estéril. Adicionalmente y para control del método, se ensayaron cepas de levaduras de referencia.

Ensayos de sensibilidad a toxinas *killer*

La evaluación de la sensibilidad de las levaduras provenientes de aislamientos clínicos a las toxinas producidas por cepas *killer* se realizó utilizando la técnica de inhibición del crecimiento en placas de agar YEPD-MB (p/v= 0,3% extracto de levadura; 1% glucosa; 0,5% peptona; 0,3% extracto de malta y 2% agar), amortiguado a pH 4,5 con solución reguladora de fosfato-citrato 0,5 M y adicionado con 0,003% p/v de azul de metileno (23).

Se sembraron suspensiones de 1×10^6 células/ml de cada uno de los aislamientos por la técnica de agar en placa. Se dejó solidificar y a continuación se sembraron estrías de las cepas *killer* de referencia e indígenas. Las placas se incubaron a 18 °C durante 48-72 h. Las levaduras en estudio se consideraron «sensibles a las toxinas» cuando alrededor de la estria de la levadura *killer* se observó un halo de inhibición del crecimiento, delimitado o no por un halo azul de células muertas. La ausencia del halo de inhibición del crecimiento indicó resistencia de la levadura a la toxina producida por la cepa *killer* (Figura 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de las levaduras provenientes de aislamientos clínicos

Los patrones de restricción (ITS-RFLP) obtenidos para los aislamientos clínicos permitieron identificar ocho especies de levaduras: *Candida albicans* (52%), *Candida*



Figura 1. Evaluación de la sensibilidad de aislamientos de levaduras de origen clínico frente a levaduras *killer* de referencia. Ensayo de inhibición del crecimiento en placa. **Estrías:** levaduras *killer*. A partir de la flecha y en sentido horario: *S. cerevisiae* K₁, *S. cerevisiae* K₂, *S. cerevisiae* K₃, *P. anomala* K₄, *P. anomala* K₅, *C. glabrata* K₆, *C. valida* K₇, *K. marxianus* K₈, *K. lactis* K₉ y *W. saturnus* K₁₀, en el centro nuevamente *W. saturnus* K₉. **Césped:** *C. glabrata* aislada de exudado vaginal (Hospital Castro Rendón); los halos de inhibición evidencian su sensibilidad a las toxinas producidas por las cuatro primeras levaduras *killer* enumeradas.

parapsilosis (17%), *Candida tropicalis* (10%), *Candida krusei* (5%), *Candida glabrata* (4%), *Candida guilliermondii* (4%), *Kluyveromyces lactis* (4%) y *Saccharomyces cerevisiae* (4%) (Tabla 2). Este resultado evidencia una gran similitud entre la diversidad de levaduras responsables de micosis no sistémicas encontrada en este trabajo y la comunicada para levaduras causantes de micosis sistémicas en un estudio multicéntrico realizado en el país (20), al menos en lo que a especies mayoritarias se refiere.

En las condiciones de estudio, el 69% de los aislamientos pertenecientes a *C. albicans* provinieron de infecciones vaginales (Tabla 2). Esta especie es considerada como la responsable del 94% de los casos de candidiasis vulvovaginal en la Argentina (19). Con respecto a las infecciones oculares, nuevamente *C. albicans* es la especie encontrada con mayor frecuencia en el mundo (27), seguida por *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (16). En nuestro trabajo, si bien las tres especies fueron identificadas en infecciones oculares, la especie mayoritaria fue *C. parapsilosis*, con el 61% de los aislamientos (Tabla 2). Es interesante destacar que dos de las tres levaduras aisladas de micosis de piel correspondieron a *S. cerevisiae* (Tabla 2), una especie considerada no patógena.

Sensibilidad a toxinas *killer*

La sensibilidad a toxinas *killer* de los 53 aislamientos de levaduras de origen clínico se evaluó frente a 10 cepas de levaduras *killer* de referencia definidas como de tipos K1 a K10 (Tabla 3) sobre la base de sus diferentes mecanismos de acción o espectros de actividad (24, 31), y frente a 46 aislamientos de levaduras *killer* indígenas de la Patagonia, de origen enológico (Tabla 1).

En las condiciones de ensayo, el 100% de los aislamientos clínicos de levaduras pertenecientes a *C. krusei* y *K. lactis* fueron resistentes a todas las toxinas producidas por las cepas *killer* de referencia (Tabla 3), pero sen-

Tabla 2. Origen e identificación (ITS-RFLP) de los aislamientos de levaduras procedentes de centros de salud

ESPECIE	Número y origen ⁽¹⁾ Patrón Molecular ⁽²⁾						Amp	CfoI	HaeIII	HinfI
	Total (%)	V	G	U	P	O				
<i>Candida albicans</i>	27 (52)	22	-	3	1	1	550	290+260	460+90	290+280
<i>Candida glabrata</i>	2 (4)	2	-	-	-	-	800	400+395	675	360+ 270
<i>Candida guilliermondii</i>	2 (4)	2	-	-	-	-	625	300+265+60	400+115+90	320+300
<i>Candida krusei</i>	3 (5)	2	1	-	-	-	494	185+170+69+56	370+90	225+160+145
<i>Candida parapsilosis</i>	9 (17)	1	-	-	-	8	530	300+230	410+110	280+260
<i>Candida tropicalis</i>	6 (10)	1	1	-	-	4	550	280+250	450+90	270+270
<i>Kluyveromyces lactis</i>	2 (4)	2	-	-	-	-	740	285+190+165+90	655+80	240+185+120+115+80
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2 (4)	-	-	-	2	-	880	385+365	320+230+180+150	365+185
TOTAL	53 (100)	32	2	3	3	13				

⁽¹⁾V: exudado vaginal; G: garganta; U: uña; P: piel; O: ojos. ⁽²⁾ITS-RFLP. Amp: amplificado de la región ITS1-DNAr 5.8S-ITS2, tamaño en pares de bases (pb). CfoI, HaeIII y HinfI: endonucleasas de restricción; tamaños de los fragmentos en pb.

Tabla 3. Sensibilidad de las levaduras de origen clínico frente a cepas de levaduras *killer* de referencia

Levaduras <i>killer</i> de referencia	Número de aislamientos sensibles (%)							
	<i>Candida albicans</i> 27 ⁽¹⁾	<i>Candida glabrata</i> 2 ⁽¹⁾	<i>Candida guilliermondii</i> 2 ⁽¹⁾	<i>Candida krusei</i> 3 ⁽¹⁾	<i>Candida parapsilosis</i> 9 ⁽¹⁾	<i>Candida tropicalis</i> 6 ⁽¹⁾	<i>Kluyveromyces lactis</i> 2 ⁽¹⁾	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2 ⁽¹⁾
<i>S. cerevisiae</i> K ₁	11 (41)	2 (100)	0	0	1 (11)	6 (100)	0	2 (100)
<i>S. cerevisiae</i> K ₂	2 (7)	1 (50)	0	0	0	0	0	2 (100)
<i>S. cerevisiae</i> K ₃	1 (4)	2 (100)	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>P. anomala</i> K ₈	13 (48)	2 (100)	2 (100)	0	2 (22)	4 (67)	0	1 (50)
<i>P. anomala</i> K ₅	0	0	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>C. glabrata</i> K ₄	0	0	0	0	0	0	0	2 (100)
<i>C. valida</i> K ₇	0	0	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>K. marxianus</i> K ₆	0	0	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>K. lactis</i> K ₁₀	3 (11)	0	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>W. saturnus</i> K ₉	6 (22)	0	0	0	0	0	0	2 (100)

⁽¹⁾Número total de aislamientos de origen clínico para cada especie identificada.

Tabla 4. Sensibilidad de las levaduras aisladas de materiales clínicos frente a levaduras *killer* indígenas de la Patagonia

Levaduras <i>killer</i> indígenas ⁽¹⁾	Número de aislamientos sensibles (%)							
	<i>Candida albicans</i> 27 ⁽²⁾	<i>Candida glabrata</i> 2 ⁽²⁾	<i>Candida guilliermondii</i> 2 ⁽²⁾	<i>Candida krusei</i> 3 ⁽²⁾	<i>Candida parapsilosis</i> 9 ⁽²⁾	<i>Candida tropicalis</i> 6 ⁽²⁾	<i>Kluyveromyces lactis</i> 2 ⁽²⁾	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2 ⁽²⁾
<i>Debaryomyces hansenii</i> 1	2 (7)	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hanseniaspora uvarum</i> 2, 5, 6 y 7	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. uvarum</i> 3 y 4	2 (7)	0	0	0	0	0	0	0
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 8	8 (29)	0	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>M. pulcherrima</i> 9	5 (18)	0	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>M. pulcherrima</i> 10 y 11	6 (22)	0	0	0	1 (11)	0	0	1 (50)
<i>M. pulcherrima</i> 12	10 (37)	0	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>M. pulcherrima</i> 13	9 (33)	0	0	0	0	0	0	1 (50)
<i>M. pulcherrima</i> 14	1 (4)	0	0	0	0	0	0	2 (100)
<i>Pichia anomala</i> 15	21 (78)	1 (50)	0	0	6 (66)	0	0	0
<i>P. anomala</i> 16	17 (63)	0	0	0	6 (66)	0	0	0
<i>P. anomala</i> 17	12 (44)	2 (100)	0	0	6 (66)	0	0	0
<i>P. anomala</i> 18	3 (11)	0	0	0	5 (55)	0	0	0
<i>Pichia kluyveri</i> 19	0	2 (100)	0	2 (67)	5 (55)	0	0	1 (50)
<i>P. kluyveri</i> 20	0	2 (100)	0	1 (33)	0	0	0	0
<i>P. kluyveri</i> 21	3 (11)	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. kluyveri</i> 22, 23 y 24	1 (4)	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. kluyveri</i> 25	5 (18)	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula glutinis</i> 26 y 27	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 28	0	2 (100)	0	0	0	0	0	2 (100)
<i>S. cerevisiae</i> 29, 30, 31, 35 y 38	1 (4)	0	0	0	0	0	0	2 (100)
<i>S. cerevisiae</i> 32, 34, 36, 37, 39 y 40	2 (7)	0	0	0	0	0	0	2 (100)
<i>S. cerevisiae</i> 33 y 42	1 (4)	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i> 41	3 (11)	0	0	0	0	0	0	2 (100)
<i>S. cerevisiae</i> 43	1 (4)	0	0	3 (100)	0	0	2 (100)	2 (100)
<i>Torulaspota delbrueckii</i> 44 y 45	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Zigosaccharomyces rouxii</i> 46	0	0	0	0	0	0	0	0

⁽¹⁾ Los números arábigos representan los números de orden otorgados a cada uno de los aislamientos indicados en la Tabla 1

⁽²⁾ Número total de aislamientos de origen clínico para cada especie identificada

sibles a la toxina producida por la cepa *killer* indígena *S. cerevisiae* MMF9 (Tablas 1 y 4). Estos aislamientos, procedentes mayoritariamente de infecciones vaginales, mostraron una sensibilidad diferente frente a ciertas cepas *killer* indígenas pertenecientes a *P. kluyveri* (Tabla 4). Por otro lado, el 100% de los aislamientos de *C. guilliermondii* y *C. tropicalis* fueron resistentes a todas las toxinas producidas por las levaduras *killer* indígenas (Tabla 4), pero sensibles a las toxinas producidas por las cepas *killer* de referencia *P. anomala* K8 y *S. cerevisiae* K1, respectivamente (Tabla 3). Las otras especies mayoritarias, *C. albicans* y *C. parapsilosis*, presentaron un 30% y un 77% de aislamientos resistentes a toxinas producidas por cepas *killer* de colección, respectivamente. Aunque estos aislamientos resultaron sensibles a algunas de las toxinas producidas por las cepas *killer* indígenas identificadas como *P. anomala* y *P. kluyveri* (datos no mostrados). Las levaduras pertenecientes a la especie minoritaria *C. glabrata* fueron mayoritariamente sensibles a las toxinas *killer* producidas por levaduras de los géneros *Pichia* y *Saccharomyces* tanto de referencia como de colección (Tablas 3 y 4), mientras que las pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* presentaron un amplio espectro de sensibilidad, también observado para los aislamientos sensibles de *C. albicans* (Tablas 3 y 4).

En resumen, los resultados presentados evidencian que la sensibilidad de las levaduras aisladas de materiales clínicos es diferente para cada especie ensayada. Si bien en las condiciones de ensayo todas las levaduras aisladas resultaron sensibles a alguna de las toxinas producidas por las cepas *killer* de colección o indígenas, ninguna de éstas presentó simultáneamente capacidad antifúngica contra todos los aislamientos.

Aunque varias toxinas *killer* con actividad biológica frente a hongos oportunistas han sido comunicadas (2, 29), su uso para profilaxis aún es escaso. En particular, existen referencias de una toxina *killer* producida por *Pichia anomala* con actividad frente a *Pneumocystis carinii* (25) y de una toxina producida por *Williopsis saturnus* efectiva frente a diferentes levaduras aisladas de materiales clínicos (3).

En el presente trabajo, las toxinas producidas por levaduras *killer* pertenecientes a la especie *P. anomala* también mostraron una gran efectividad frente a las levaduras de origen clínico. En particular, el aislamiento indígena 15 de *P. anomala* fue capaz de inhibir el desarrollo del 78% de los aislamientos de *C. albicans*, del 66% de los de *C. parapsilosis* y del 50% de los de *C. glabrata* (Tabla 4). El aislamiento 19 perteneciente a la especie *P. kluyveri* también presentó un fenotipo *killer* de amplio espectro de acción. En conjunto, las toxinas producidas en las condiciones ensayadas por estos dos aislamientos *killer* indígenas, identificados de acuerdo con su origen como *P. anomala* DVMais 5 y *P. kluyveri* HCMeiss 5 (Tabla 1), fueron capaces de inhibir el crecimiento del 51% de las levaduras evaluadas (Tabla 4).

Finalmente, el comportamiento *killer* del aislamiento indígena 15 de *P. anomala* frente a los aislamientos de levaduras de origen clínico resultó diferente del observado en las dos cepas *killer* de referencia de la misma especie (Tablas 3 y 4). Este resultado podría estar indicando la presencia de una nueva toxina *killer* en poblaciones indígenas de la especie *P. anomala*.

Agradecimientos: al Dr. Luis Piaciola y al personal de los laboratorios de los Hospitales Heller y Castro Rendón de la ciudad de Neuquén, quienes facilitaron las muestras para este estudio. Al Dr. Brunzini y al personal del laboratorio de su centro oftalmológico, quienes aislaron las levaduras patógenas oculares. A la Universidad de Valencia y al CSIC (España) por permitirnos el acceso a la base de datos www.yeast-id.com para la identificación de levaduras. Este trabajo fue realizado en el marco de los proyectos 04 I-117 y PE 356 de la Universidad Nacional del Comahue y del PIP 6494 del CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abranches J, Valente P, Nobrega HN, Fernandez FAS, Mendoncahagler LC, Hagler AN. Yeast diversity and killer activity dispersed in fecal pellets from marsupials and rodents in a Brazilian tropical habitat mosaic. *FEMS Microbiol Ecol* 1998; 26: 27-33.
2. Buzzini P, Martini A. Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. *Med Mycol* 2001; 39: 479-82.
3. Buzzini P, Corazzi L, Turchetti B, Buratta M, Martín A. Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 238: 359-65.
4. Chen SCA, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol* 2002; 40: 333-57.
5. Ciardo DE, Schär G, Böttger EC, Altwegg M, Bosshard PP. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 77-84.
6. de Llanos R, Querol A, Planes AM, Fernández-Espinar MT. Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. *System Appl Microbiol* 2004; 27: 427-35.
7. Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 653-7.
8. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 329-37.
9. Fidel PL. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends Microbiol* 2004; 12: 220-7.
10. García Heredia M, García SD, Copolillo EF, Cora Eliseth M, Barata AD, Vay CA, et al. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 9-12.
11. Groll, AH. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol* 1998; 6: 117-24.
12. Izgu F, Altinbay D. Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on gram-positive pathogenic bacteria. *Microbios* 1997; 89: 15-22.
13. Kurtzman C, Fell J. The yeast, a taxonomic study. Fourth edition, Amsterdam, Elsevier Science. 1998.

14. Law D, Moore CB, Joseph LA, Keaney MGL, Denning DW. High incidence of antifungal drug resistance in *Candida tropicalis*. Int J Antimicrob Agents 1996; 7: 241-5.
15. López C, Giro L, Ramos L, Ramón S, Bulacio L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. Rev Argent Microbiol 2005; 37: 16-21.
16. Muallen M, Alfonso E, Romano A, Miller D, Kurstin J, Marangon F, et al. Bilateral *Candida parapsilosis* interface keratitis after laser in situ keratomileusis. J Cataract Refract Surg 2003; 29: 2022-5.
17. Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Walter MJ, Hoffman, BB. Farmacología Integrada. Madrid, Harcourt Brace. 1998.
18. Patel A, Gillespie B, Sobel J, Leaman D, Nyirjesy P, Weitz B, et al. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: Results of a prospective cohort study. Am J Obs Gyn 2004; 190: 644-53.
19. Rodero L, Davel G, Córdoba S, Soria M, Canteros C, Hochenfellner F, et al. Estudio multicéntrico sobre candidiasis nosocomial en la República Argentina. Rev Argent Microbiol 1999; 31: 114-9.
20. Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros CE, et al. Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. Rev Argent Microbiol 2005; 37: 189-95.
21. Sanglard D, Odds F. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002; 2: 73-85.
22. Sangorrín M, Zajonskovsky I, van Broock M, Caballero A. The use of killer biotyping in an ecological survey of yeast in an old patagonian winery. World J Microbiol Biotechnol 2002; 18: 115-21.
23. Sangorrín M, Zajonskovsky I, Lopes C, Rodríguez M, Van Broock M, Caballero A. Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia. J Basic Microbiol 2001; 41: 105-13.
24. Schmitt MJ, Breinig F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. FEMS Microbiol Rev 2002; 26: 257-76.
25. Séguy N, Polonelli L, Dei-Cas E, Cailliez JC. XVIII Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of *Pneumocystis*. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 22: 145-9.
26. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stockes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Research 2004; 4: 369-76.
27. Thomas, PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 730-97.
28. Vargas-Montiel H. Patógenos emergentes en micosis cutáneas y sistémicas. Dermatología Venezolana 2004; 42: 4-18.
29. Walker GM, McLeod AH, Hodgson VJ. Interaction between killer yeast and pathogenic. FEMS Microbiol Lett 1995; 127: 213-22.
30. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. PCR protocols A guide to methods and applications. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, With TJ, editors. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. San Diego, Academic Press, 1990, pp 315-22.
31. Young TW. Killer yeasts En: Rose AH, Harrison JS, editors. The yeasts. London: Academic Press, 1987; pp 131-64.