

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS *KILLER* COM POTENCIAL
PARA APLICAÇÃO EM BIOTIPAGEM DE MICRORGANISMOS
PATOGENICOS HUMANOS**

TESE DE DOUTORADO

ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA

Orientador: Dra. Marilene Henning Vainstein

Co-orientador: Dra. Patrícia Valente

Outubro, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS *KILLER* COM POTENCIAL
PARA APLICAÇÃO EM BIOTIPAGEM DE MICRORGANISMOS
PATOGENICOS HUMANOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia celular e molecular.

ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA

Farmacêutico (UFRGS/2002)

Orientador: Dra. Marilene Henning Vainstein

Co-orientador: Dra. Patrícia Valente

Outubro, 2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À Professora Marilene Vainstein por ter me propiciado a obtenção do título de doutor, acreditando num projeto ousado e fora de sua habitual linha de pesquisa. A liberdade e confiança dada pela senhora, do início ao fim deste projeto, me tornou com certeza um pesquisador diferenciado, sem medo de seguir no seu ideal de pesquisa.

Em especial a minha amiga e, sobretudo ensinadora de grande parcela do conhecimento obtido na pós-graduação *stricto-sensu* Patrícia Valente, por acreditar no meu potencial como pesquisador e docente, por ter sido antes de tudo uma verdadeira mestra, sempre me mostrando o melhor caminho e, principalmente, me apoiando em todas as importantes decisões da minha vida. Você representa para mim o alicerce de ter alcançado em menos de cinco anos os títulos de mestre e doutor. Muito obrigado mesmo.

Ao aluno de iniciação científica Emanuel de Souza muito obrigado pelas parcerias de trabalho e de seminários. Espero ter contribuído na tua formação, tanto quanto você representou para a minha.

Em especial as colegas de laboratório Melissa Landell, Josiane Faganello e Roberta Bussamara pela amizade e por tornarem o período de laboratório um ótimo e inesquecível ambiente de trabalho; e a todos que formam essa família “barulhenta” do laboratório 220 do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Com muito carinho à minha noiva Rubia do Nascimento pelo companheirismo e apoio, e por ter estado nos momentos vitais desta tese ao meu lado, sempre com muito amor e dedicação, tornando nossa vida juntos especial; um verdadeiro sonho que se tornou realidade.

À minha família, em especial meu pai Renato Fuentefria e minha mãe Branca Fuentefria meu muito obrigado pela educação que me deram e pelo apoio incondicional e constante em todas as decisões da minha vida. Dedico essa tese a vocês.

Sobretudo a Deus, sem o qual nada seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
OBJETIVOS	35
1. Objetivo geral.....	35
2. Objetivos específicos.....	35
1. MATERIAL E MÉTODOS	36
1.1 Prospecção das leveduras <i>killer</i>	36
1.1.1 Culturas de leveduras.....	36
1.1.2 Culturas de cepas sensíveis.....	36
1.1.3 Teste de triagem para detecção de linhagens com fenótipo <i>killer</i>	37
1.2 Identificação das leveduras <i>killer</i> pelas de características fenotípicas.....	37
1.3 Confirmação da Identificação através da análise de seqüências de rDNA.....	38
1.4 Caracterização do genótipo <i>killer</i>	39
1.4.1 Caracterização do material genético extracromossomal.....	39
1.4.2 Testes de cura do fenótipo <i>killer</i>	40
1.5 Otimização da composição de um meio de cultura ideal para produção da toxina <i>killer</i>	40
1.5.1 Levedura selecionada.....	40
1.5.2 Pré-seleção dos compostos carbonados, nitrogenados e minerais.....	40
1.5.3 Determinação do pH e temperatura ótima de cultivo para produção da toxina <i>killer</i>	41
1.6. Inóculo, cultivo e dosagem da atividade <i>killer</i>	42
1.7 Avaliação do potencial das leveduras prospectadas para a utilização em biotipagem de microrganismos.....	42

1.7.1 Biotipagem de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	42
1.7.2 Biotipagem de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	43
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
2.1 Prospecção das leveduras <i>killer</i>	45
2.2 Identificação por características fenotípicas e confirmação da identificação através do sequenciamento da região D1/D2 no gene 26S do rDNA.....	52
2.3 Identificação de uma espécie nova de levedura <i>killer</i>	54
2.4 Caracterização do genótipo <i>killer</i>	56
2.4.1 Caracterização das moléculas codificantes do fenótipo <i>killer</i> e avaliação do método de cura.....	56
2.5 Otimização da composição de um meio de cultura e das condições de temperatura e pH ideais para produção da toxina <i>killer</i> KT89.....	63
2.6 Biotipagem de microrganismos pelo sistema <i>killer</i>	66
2.6.1 Biotipagem de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	66
2.6.1 Biotipagem de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	68
2.7 Descrição da espécie nova <i>Trichosporon insectorum</i>	
Manuscrito 1: <i>Trichosporon insectorum</i> sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous <i>killer</i> yeast	70
2.8 Biotipagem de <i>Cryptococcus neoformans</i> .	
Manuscrito 2: Typing and patterns of cellular morphological alterations in <i>Cryptococcus neoformans</i> and <i>Cryptococcus gattii</i> isolates exposed to a panel of <i>killer</i> yeasts	89
2.9 Biotipagem de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	
Manuscrito 3: Typing of <i>Staphylococcus epidermidis</i> clinical strains by a selected panel of Brazilian <i>killer</i> yeasts	100
3. CONCLUSÕES FINAIS	120
4. PERSPECTIVAS	122
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
6. ANEXOS	135

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC:** *American Type Culture Collection*
- CBS:** Centralbureau voor Schimmelcultures, Holanda
- CBiot:** Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
- cm:** Centímetro
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- mM:** Milimolar
- μL:** Microlitro
- mL:** Mililitro
- μg:** Micrograma
- NRRL:** Coleção de culturas ARS, National Center for Agricultural Utilization Research, USA
- pH:** Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio numa solução
- rpm:** Rotações por minuto
- RNA:** Ácido ribonucléico
- ITS:** Espaçador interno transcrito
- kDa:** Quilodaltons
- M:** Molar
- MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura
- min:** Minuto
- mM:** Milimolar
- mm:** Milímetro
- KPS:** Padrões de sensibilidade à toxina *killer*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Sistema de replicação dos vírus de dsRNA em leveduras <i>killer</i> fundamental para a expressão do gene codificante da toxina.....	25
Figura 2.	Testes de triagem em Ágar YM-MB para a detecção do fenótipo <i>killer</i>	45
Figura 3.	Gel de agarose (1,2%) dos ácidos nucléicos totais tratados com RNase A e S1 Nuclease das cepas micocinogênica selvagem e curada <i>Trichosporon coremiforme</i> KYQU83 e <i>Trichosporon insectorum</i> KYQU89.....	60
Figura 4.	Gel de agarose (1,2%) dos ácidos nucléicos totais tratados com RNase A e S1 Nuclease das cepas micocinogênicas selvagem e curada <i>Trichosporon coremiiforme</i> KYLC83 e KYLC60.....	61
Figura 5.	Gel de agarose (1,2%) dos ácidos nucléicos totais tratados com RNase A e S1 Nuclease das cepas micocinogênicas selvagens e curadas de <i>Trichosporon faecale</i> KYQU88, <i>Trichosporon faecale</i> KYQU72 e <i>Trichosporon japonicum</i> KYQU139.....	62
Figura 6.	Ensaio das condições ótimas de temperatura para a produção da toxina <i>killer</i> pela cepa KYQU89 no meio YM.....	64
Figura 7.	Ensaio das condições ótimas de pH para a produção da toxina <i>killer</i> pela cepa KYQU89 no meio YM.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais características das toxinas <i>killer</i> mais investigadas.....	20
Tabela 2.	Listagem de leveduras isoladas de diferentes substratos e pertencentes à Coleção de Culturas de Leveduras do Departamento de Microbiologia da UFRGS realçando as que apresentaram a característica <i>killer</i> contra as leveduras sensíveis <i>C. glabrata</i> ATCC2001 e/ou <i>C. neoformans</i> ATCC28957.....	46
Tabela 3.	Dados quantitativos do halo inibitório nos testes de triagem das cepas com melhor perfil micocinogênico.....	49
Tabela 4.	Identificação fenotípica e molecular das 32 leveduras <i>killer</i> selecionadas para os testes de biotipagem.....	58

RESUMO

Uma das formas de se realizar estudos epidemiológicos de dispersão de patógenos é pela discriminação intra-específica (biotipagem) desses microrganismos em subgrupos (biotipos). Métodos fenotípicos que permitem a discriminação de linhagens clínicas são almejados principalmente pela facilidade de execução e por terem menor custo, quando comparados com os métodos moleculares. O sistema *killer*, baseado em padrões de sensibilidade à toxina, pode representar uma ferramenta simples, barata, sensível e reprodutível para biotipagem de microrganismos de importância clínica. Neste estudo, foi pesquisada a presença deste fenótipo em 595 isolados de alimentos e de fontes ambientais, de onde foram selecionadas 32 cepas para testes de identificação molecular, caracterização genética do fenótipo *killer*, caracterização morfológica do mecanismo de ação da toxina e aplicação em painéis de biotipagem. A linhagem KYQU89 (CBS10423), proveniente de queijo, foi detectada como uma espécie nova, com seqüência idêntica a dois isolados *killer* oriundos de insetos. As três linhagens demonstraram ser relacionadas ao clado *Ovoides* no gênero *Trichosporon*, sendo caracterizadas por sequenciamento da região D1/D2 do rDNA, da região interespaçadora ITS e perfil bioquímico. A espécie nova foi denominada *Trichosporon insectorum*. Vinte linhagens *killer* foram selecionadas para compor um painel de biotipagem sobre cem isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A partir dos padrões de sensibilidade à toxina, foi gerado um dendrograma

demonstrando a total discriminação das linhagens. A ação letal da toxina sobre as células destas duas espécies de *Cryptococcus* foi observada por microscopia eletrônica de varredura e óptica, evidenciando que não houve a formação de poros na parede celular, mas sim uma provável interferência no ciclo celular da célula. Da mesma forma, um painel de 11 linhagens *killer* selecionadas foi utilizado para a biotipagem de cepas multi-resistentes de *Staphylococcus epidermidis*, provenientes de dois hospitais em Porto Alegre, RS, também sendo capaz de discriminá-las totalmente.

ABSTRACT

One of the forms of performing epidemiological studies of dispersion of pathogenic microorganisms is by means of intra-specific discrimination (biotyping) of these microorganisms in sub-groups (biotype). Phenotypic methods that allow the clinical discrimination of strains are needed, especially because they are easy to perform and have low cost, when compared to molecular methods. The *killer* system, based on patterns of sensitivity towards the toxin, can represent a simple, cheap, sensible and reproducible tool for biotyping of microorganisms of clinical importance. In our study, the presence of this phenotype was evaluated in 595 isolates from natural environments and food and 32 *killer* strains were selected for molecular identification, genetic characterization of *killer* phenotype, morphologic characterization of the mechanism of action, and application in biotyping panels. The strain KYQU89 (CBS10423), isolated from cheese, was found to be a new species, with D1/D2 sequence identical to two *killer* isolates from insects. The three strains were shown to be related to the Ovoides clade of the genus *Trichosporon*, and were characterized by sequencing of the D1/D2 region of the LSU rDNA and physiological profiles. The new species was called *Trichosporon insectorum*. Twenty *killer* strains were selected to compose a panel of biotyping against one hundred clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Based

on the *killer* sensitivity patterns, a dendrogram demonstrating the total discrimination of the strains was done. The lethal action of the toxin on the cells of *Cryptococcus* was observed by means of optical and scanning electron microscopy, showing that there was no formation of pores on the cell surface of the sensitive cells in contact with the toxins, but a probable interference in the cell cycle. In the same way, a panel of 11 selected killer strains was used for the biotyping of multi-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains, provenient from two hospitals in Porto Alegre, RS, being also capable of discriminating all the strains.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Leveduras são organismos pertencentes ao reino *Fungi*, possuindo características típicas dos fungos como presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear (célula eucariótica), aclorofilados, nutrição heterotrófica através de absorção dos nutrientes, reprodução sexuada através de células especializadas denominadas esporos, e ausência de motilidade, entre outras. Se diferenciam dos demais fungos por possuírem um talo predominantemente unicelular, realizarem a reprodução assexuada por brotamento ou fissão e não formarem corpos de frutificação (KURTZMAN & FELL, 1998). Os microrganismos considerados como leveduras são encontrados nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* e entre os fungos mitospóricos, anteriormente denominados Deuteromycetes (sem reprodução sexuada conhecida), constituindo um grupamento artificial (HAWKSWORTH *et al.*, 1995). Geralmente são encontrados em folhas, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares, mas também podem ser isolados do ar, do solo, de águas de lagos, rios e mares; da pele e do intestino de animais, incluindo associações com insetos (KURTZMAN & FELL, 1998).

Leveduras *killer*

Leveduras micocinogênicas, ou leveduras *killer*, secretam toxinas denominadas de toxinas *killer* ou micocinas que são letais a outras espécies de leveduras e também para outros microrganismos, como fungos filamentosos, bactérias cocóides gram-positivas, *Mycobacterium tuberculosis* e *Pneumocystis*

jiroveci (GOLUBEV, 2006). Este comportamento foi observado pela primeira vez há 40 anos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* por BEVAN & MAKOWER (1963), sendo atualmente relatado em mais de 100 espécies de vinte gêneros distintos, inclusive em várias cepas de mesma espécie, tais como em *Cryptococcus laurentii*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *S. cerevisiae* (MAGLIANI *et al.*, 1997; GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006).

As toxinas *killer* ou micocinas, são proteínas ou glicoproteínas de baixa massa molecular, que atuam sobre as células sensíveis de outros microrganismos sem o contato direto célula-célula, mas já sabidamente com um mecanismo específico de ação, incluindo receptores da parede e membrana celular das leveduras sensíveis. Apesar destas toxinas poderem inibir outros microrganismos além das leveduras, não há ainda uma correta compreensão dos mecanismos farmacodinâmicos de interação com procariotos ou outros eucariotos (GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006). Com exceção de *Zygosaccharomyces bailii*, as leveduras micocinogênicas são imunes a ação de sua própria toxina, mas podem ser suscetíveis a toxinas produzidas por outras espécies (SCHMITT & BREINIG, 2002; 2006). Como mencionado anteriormente, o fenótipo *killer* foi observado pela primeira vez em *S. cerevisiae* por BEVAN & MAKOWER (1963) que propuseram que determinadas linhagens de *S. cerevisiae* podiam ser classificadas em um dos três fenótipos: *killer*, sensível e neutro (que nem secretam toxinas *killer* e nem são sensíveis à sua ação). Quando células *killer* e sensíveis cresciam eram inoculadas simultaneamente em uma mesma cultura, uma grande proporção das células sensíveis morria (MAGLIANI *et al.*, 1997; GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006).

No habitat natural, esta toxina pode conferir uma grande vantagem na competição com leveduras sensíveis por facilitar o acesso a nutrientes disponíveis no substrato (FREDLUND *et al.*, 2002), embora o seu papel em ambientes naturais não esteja bem elucidado. Sabe-se ao certo que é um mecanismo de competição, podendo causar a exclusão de indivíduos ou populações sensíveis. O papel ecológico do fenótipo *killer* tem sido extensivamente estudado em comunidades de leveduras associadas a plantas e alimentos, os mais importantes habitats para as leveduras micocinogênicas (GANTER & STARMER, 1992; MAGLIANI *et al.* 1997; GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006). Leveduras *killer* podem ser isoladas de várias fontes, entretanto ocorrem mais frequentemente em habitats com alta densidade populacional, onde há necessidade de um mais intenso processo de competição ecológica. Nestes nichos, as leveduras *killer* possuem um maior espectro de atividade contra microrganismos de outros habitats, indicando claramente que o fenótipo *killer* possui uma importante função em defender o nicho ecológico ocupado contra microrganismos “invasores” que requerem os mesmos nutrientes e, portanto, podem ocupar o mesmo nicho. Em outras palavras, a atividade *killer* ou micocinogênica possui uma função na manutenção da composição da comunidade através da exclusão de microrganismos competidores (GANTER & STARMER, 1992; GOLUBEV *et al.*, 2002, FREDLUND *et al.*, 2002; GOLUBEV, 2006).

A expressão da atividade *killer* é influenciada por várias variáveis, como pH do meio, temperatura de incubação ou tratamento, composição e propriedades físico-químicas do meio e concentração de células sensíveis. Entretanto, a mais importante condição é o pH do meio de cultura. A atividade *killer* é expressa sob condições

ácidas, usualmente pH 3 a 6, mas, como regra, as toxinas *killer* possuem maior atividade em pH 4,5 (CRISEO *et al.*, 1999; FUENTEFRIA *et al.*, 2006; BUZZINI *et al.*, 2007). Além disso, a adição de glicerol no meio de cultura (5-15%) produz um aumento das zonas de inibição nas linhagens produtoras testadas, assim como nas leveduras *killer* halotolerantes, nas quais a adição de NaCl de 4 a 12% fornece uma condição ótima de atividade (LLORENTE *et al.*, 1997). Por causa de sua natureza protéica, as toxinas *killer* são inativadas em altas temperaturas e apresentam um decréscimo de atividade em função do tempo, característica semelhante ao encontrado com as bacteriocinas, toxinas procarióticas com características moleculares e aplicação final semelhante (MAGLIANI *et al.*, 2004; GOLUBEV, 2006). Também da mesma forma que as bacteriocinas, as toxinas *killer* são mais estáveis em meios sólidos do que em meios líquidos, e a agitação pode causar sua inativação em função da alteração das estruturas secundárias protéicas ligadas à porção glicosídica. A concentração das células sensíveis no meio de cultura pode influenciar a sensibilidade do bioensaio; por exemplo, quando a camada de células espalhadas no meio de cultura é muito densa, o halo inibitório é menor do que esperado ou pode até se tornar indetectável (KURTZMAN & FELL, 1998; GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006).

As toxinas *killer* podem ser classificadas em três grupos: a) protéicas ou glicoprotéicas de massa molecular acima de 5 kDa, mais comuns, onde a K1 é a mais estudada; b) microcinas e c) glicolipídeos.

As microcinas, glicoproteínas com massa molecular de aproximadamente 1 kDa, termoestáveis e resistentes a proteases, produzidas principalmente por

leveduras basidiomicéticas, receberam essa denominação devido por analogia à baixa massa molecular das bacteriocinas (GOLUBEV & SHABALIN, 1994; PUCHKOV *et al.*, 2001; PUCHKOV *et al.*, 2001). Essas toxinas glicolípídicas não possuem a porção protéica ligada ao radical glicosídico, mas sim com uma porção lipídica, sendo consideradas como agentes emulsificantes com poder antimicrobiano, descritos em *Cryptococcus humicola* (PUCHKOV *et al.*, 2002), *Pseudozyma flocculosa* (CHENG *et al.*, 2003), *P. fusiformata* (GOLUBEV *et al.*, 2001) e *Sympodiomyces paphiopedili* (GOLUBEV *et al.*, 2004). Assim como ocorre com as toxinas *killer* glicoprotéicas, a sua atividade antifúngica ocorre sob condições ácidas; mas sua especificidade de ação é completamente distinta. O padrão de atividade *killer* desse tipo de toxina não é taxonomicamente específico, e por esta razão, não se aplica, por exemplo, para perfil de biotipagem (GOLUBEV *et al.*, 2004; GOLUBEV, 2006).

Quanto ao modo de ação das leveduras *killer* em geral, o mecanismo nas células sensíveis ocorre em duas fases: a ligação ao receptor de membrana e o efeito específico dentro da célula após a translocação da toxina. Vários mecanismos têm sido propostos para esta segunda fase: aumento da próton-permeabilidade na membrana citoplasmática, provocando ruptura com perda de íons potássio, ATP e outros componentes intracelulares; inibição da síntese de DNA; bloqueio do ciclo celular e inibição da síntese de componentes da parede celular como β -1,3-glicana, β -1,6-glicana, α -1,3-manose ou quitina (CASTORIA *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2002; SANTOS & MARQUINA, 2004; GOLUBEV, 2006). O efeito descrito para as

toxinas K1 e K28 secretadas por *S. cerevisiae*, por exemplo, está relacionado com a indução de uma atividade anormal dos canais iônicos com a formação de poros e inibição da síntese de DNA na fase G1/S, respectivamente, o que resulta na morte da célula por perda de íons ou por apoptose. Por sua vez, a toxina secretada por *Kluyveromyces lactis* interfere na fase G1 do ciclo celular, enquanto que a micocina secretada por *Williopsis saturnus* var. *mrakii* inibe a síntese da β -1,3-glicana (GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006).

A diferença entre esses mecanismos depende sobretudo da base genética do sistema *killer*: cromossômico ou citoplasmático. Muito mais atenção tem sido dada aos elementos genéticos extra-cromossomais, como os vírus de RNA de fita dupla (dsRNA) e os plasmídios de DNA de fita dupla linear (dsDNA), responsáveis pela maioria dos fenótipos micocinogênicos. Os vírus dsRNA associadas a esse fenótipo são classificadas no gênero *Totivirus*, família *Totiviridae* (WICKNER, 1996; SCHIMITT & BREINIG, 2002). As toxinas *killer* com base genética extracromossomal são codificadas por diferentes vírus dsRNA satélites, denominados M, que dependem de outro grupo de vírus dsRNA “helper”, denominados L-A. Esse segundo grupo, codifica as proteínas do capsídeo viral (Gag C) e a polimerase responsável pela replicação de ambos os tipos de vírus (C Pol), o vírus dsRNA M e o dsRNA L-A. Portanto, de acordo com o esquema ilustrado na figura 1; inicialmente o vírus ssRNA L-A replica-se tornando-se dupla fita (dsRNA) e após os processos de transcrição e tradução codificantes das proteínas do capsídeo, ocorre a formação do capsômero

do vírus ssRNA M. Este por sua vez, após seu processo de replicação, transcrição e tradução (e modificações pós-traducionais), codifica a toxina *killer* ativa.

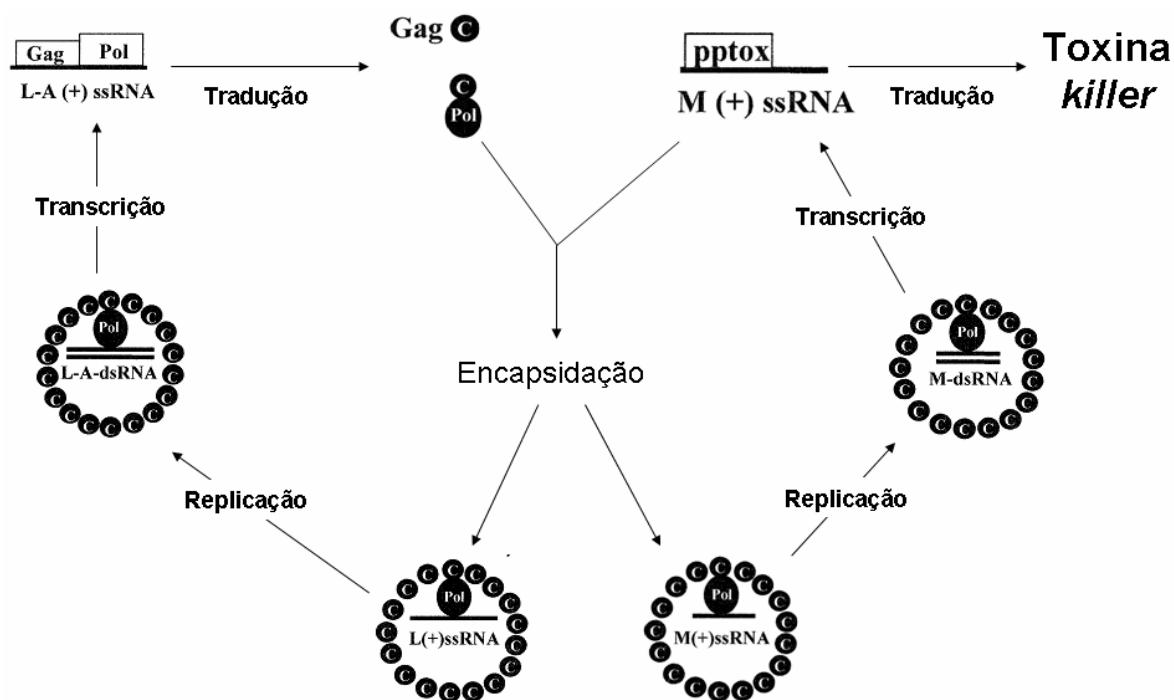


Figura 1. Sistema de replicação dos vírus de dsRNA em leveduras *killer*

fundamental para a expressão do gene codificante da toxina.

A cura das partículas virais nessas leveduras *killer*, através de tratamentos por choque térmico, radiação ultravioleta, com brometo de etídio, cicloheximida ou corantes mutagênicos, resulta na perda da atividade micocinogênica e da imunidade para a sua própria toxina. Linhagens micocinogênicas associadas a plasmídeo (dsDNA) também perdem seu fenótipo de atividade e imunidade em processos de cura, como se observou na levedura *K. lactis* (SCHAFFRATH & BREUNIG, 2000;

GOLUBEV, 2006). O sistema de codificação genético para toxinas *killer* glicolipídicas até então foi apenas descrito como controlado por genes cromossomais, visto que material genético citoplasmático nunca foi detectado em espécies que secretam este tipo de micocina (CHENG *et al.*, 2003).

Os dois mais bem estudados sistemas *killer* são o de *S. cerevisiae* e de *K. lactis*. A primeira por representar a espécie mais usada como modelo de manipulação genética de expressão de genes com interesse em organismos eucarióticos superiores. A segunda, *K. lactis*, por ser também de fácil manipulação genética, mas principalmente, por ser filogeneticamente distante de *S. cerevisiae*, o que permite uma melhor comparação da expressão de genes homólogos em ambas as espécies (MAGLIANI *et al.*, 1997; GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006).

Sistema *killer* em *Saccharomyces cerevisiae*

O mais bem elucidado sistema *killer* é o de *S. cerevisiae*. Três vírus dsRNA são descritos como (ScV-M1, ScV-M2 and ScV-M28), cada um codificando uma toxina específica (K1, K2 and K28, respectivamente) e um componente que mantém a auto-imunidade (L-A). Em cada caso, o fenótipo *killer* requer a presença de dois vírus dsRNA diferentes: um vírus dsRNA L-A “helper” e os vírus dsRNA M (1,8, 1,5, e 1,9 kb) que codificam a toxina *killer*. *In vivo*, os genomas dsRNA são encapsidados separadamente em partículas virais (VLPs) que se mantêm estáveis no citoplasma das células de leveduras infectadas. O vírus L-A vírus sozinho não confere um fenótipo em seu hospedeiro e são vírus com replicação autônoma independente

(CASTON *et al.*, 1997; WICKNER, 1996; SCHMITT *et al.*, 1996; SCHIMITT & BREINIG, 2002, NOVOTNÁ *et al.*, 2004).

As toxinas *killer* também podem ser codificadas por genes nucleares produzindo toxinas denominadas KHR (termoestável) e KHS (termosensível), monômeros de 20 e 75 kDa, respectivamente (WICKNER, 1996; SCHMITT *et al.*, 1996; MAGLIANI *et al.*, 1997; BARTUNEK *et al.*, 2001; BREINIG *et al.*, 2002; FLEGELOVÁ *et al.*, 2002, GOLUBEV, 2006).

Cada toxina K1, K2 e K28 é sintetizada como uma pré-toxina que sofre modificações pós-traducionais resultando numa toxina madura e ativa. Dentre essas três toxinas, a K1 é a mais estudada quanto a sua síntese e mecanismo de ação nas células sensíveis. Estruturalmente, é um heterodímero de 19kDa (sub-unidades alfa de 9,5 kDa e beta de 9 kDa) derivado de uma pré-toxina de 42 kDa, com domínios alfa, beta e gama. Uma vez sintetizada, essa pré-toxina vai para o retículo endoplasmático, onde passa por modificações pós-traducionais e forma o heterodímero ativo pronto para secreção. As toxinas K2 e K28 possuem estrutura e mecanismos de síntese semelhantes a K1, sendo ambos heterodímeros ativos após processamento de uma pré-toxina codificada pelos vírus M satélites (SCHMITT *et al.*, 1996; MAGLIANI *et al.*, 1997, BARTUNEK *et al.*, 2001, BREINIG *et al.*, 2002; NOVOTNÁ *et al.*, 2004).

Quanto ao mecanismo de ação, as toxinas K1, K2 e K28 requerem uma ligação inicial com um receptor de membrana específico (β -1,6-glicana no caso das toxinas K1 e K2, e manoproteína no caso da toxina K28), dependente das condições

ótimas de pH (4,6) e da concentração da toxina no sítio de ligação. O segundo passo, no caso das toxinas K1 e K2, é a interação da toxina com a membrana plasmática da célula sensível, momento responsável pela ação letal da toxina sobre a célula, pois atua alterando o potencial de membrana e provocando a perda de íons e ATP. A toxina K28 atua sobre o ciclo celular da célula alvo, especificamente na fase G1/S, impedindo a segregação do DNA da célula mãe para a célula filha no processo de divisão assexuada por brotamentos, com posterior apoptose da célula, enquanto a toxina K1 ativa canais de íons na membrana citoplasmática formando poros que, por sua vez, provocam a perda de prótons, íons e ATP (WICKNER, 1996; SCHIMITT & BREINIG, 2002, GOLUBEV, 2006; BUZZINI *et al.*, 2007).

Sistema *killer* em *Kluyveromyces lactis*

O sistema *killer* associado a linhagens de *K. lactis* não é codificado por dsRNA, nem por genes cromossomais, mas por plasmídeos de dsDNA linear. Cada cepa *killer* contém cerca de 50 a 100 cópias por célula de cada um dos dois plasmídeos lineares denominados pGKL1 (k1) e pGKL2 (k2), respectivamente 8.874 kb e 13.447 kb.

K. lactis secreta uma holoenzima glicoprotéica heterotrimérica (α de 99 kDa, β de 30 kDa e γ de 27,5 kDa), denominada de zimocina, que inibe um grande número de espécies sensíveis do gênero *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Zygosaccharomyces*, bem como cepas não-*killer* de *K. lactis* (MEINHARDT *et al.*, 1997; MAGLIANI *et al.*, 1997; SCHAFFRATH & BREUNIG,

2000; SCHMITT & BREINIG, 2002; GOLUBEV, 2006). A toxina heterotrimérica, composta na realidade de um polipeptídeo glicosilado α , e dois não glicosilados β e γ , quando matura, interrompe de modo irreversível o ciclo de divisão celular na célula sensível, especificamente na fase G1. As células tratadas com a toxina mantêm seu potencial de membrana, ao contrário de outras toxinas *killer* que atuam como ionóforos.

Entretanto, somente a subunidade γ parece estar envolvida neste mecanismo. A subunidade α apresenta uma atividade quitinolítica, permitindo que a subunidade γ penetre na célula e atue no núcleo; por sua vez, a subunidade β , parece atuar em conjunto com a subunidade α e também no processo de ligação ao receptor de quitina na célula. Células de *S. cerevisiae* tratadas com zimocina não apresentaram morte celular por formação de poros (o que indicaria a ação ionófora), mas sim impedimento da reprodução assexuada por brotamento, o que caracteriza um efeito específico sobre o ciclo celular na fase G1 (GOLUBEV, 2006). A produção e o mecanismo de ação da zimocina são muito semelhantes à toxina K28 secretada por *S. cerevisiae*, onde há a necessidade de ligação inicial com glico-receptores na parede da célula sensível com posterior carreamento da sub-unidade ativa da toxina para o citoplasma da célula alvo (SCHAFFRATH & BREUNIG, 2000; SCHMITT & BREINIG, 2002).

A imunidade de *K. lactis killer* é estritamente relacionada com a manutenção do plasmídeo k1. Experimentos mostram que isolados livres do plasmídeo k1, mas ainda com cópias ativas do plasmídeo k2, são sensíveis à zimocina e indistinguíveis

fenotipicamente de outras cepas de *K. lactis* livres de plasmídeos (MAGLIANI *et al.*, 1997; SCHAFFRATH & BREUNIG, 2000).

Na Tabela 1, modificada de BUZZINI *et al.*, (2007) e GOLUBEV (2006), estão mostradas as principais características das toxinas *killer* estudadas até o momento.

Tabela 1. Principais características das toxinas *killer* mais investigadas.

Espécie <i>killer</i>	Linhagem	Toxina	Base genética	Massa (kDa)	Receptor	Mecanismo de ação
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	VKM Y-1265	ND*	dsRNA	15	ND	ND
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CYC 1021	ND	Cromossomal	23	β -(1,6)-glicana	ND
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	470	ND	dsRNA	18	β -(1,6)-glicana	ND
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NCNYC 587	K6	ND	42	ND	ND
<i>Kluyveromyces lactis</i>	AWJ137	ND	plasmídio	156	Quitina	Inibição do ciclo celular na fase G1
<i>Pichia acaciae</i>	NRRLY-18665	ND	dsRNA	187	Quitina	Inibição do ciclo celular na fase G1
<i>Pichia anômala</i>	WC 65	WC65	Cromossomal	83	β -glicana	ND
<i>Pichia farinosa</i>	KK1	SMKT	Cromossomal	14	ND	Aumento da permeabilidade de íons na MC ^a
<i>Pichia inositovora</i>	NRRLY-18709	ND	dsRNA	>100	ND	ND
<i>Pichia kluyveri</i>	1002	ND	Cromossomal	19	ND	Formação de canais de íons
<i>Pichia membranifaciens</i>	CYC 1106	ND	Cromossomal	18	β -(1,6)-glicana	Formação de canais de íons
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KL88	K1	dsRNA	19	β -(1,6)-glicana	Formação de canais de íons
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCYC 713	K2	dsRNA	21.5	β -(1,6)-glicana	Aumento da permeabilidade de íons na MC ^a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 8112	K28	dsRNA	21	Manoproteínas	Inibição do ciclo celular na fase G1/S
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	111	KHR	Cromossomal	20	ND	Aumento da permeabilidade de íons na MC ^a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	115	KHS	Cromossomal	75	ND	Aumento da permeabilidade de íons na MC ^a

<i>Schwannyomyces occidentalis</i>	ATCC 44252	ND	Cromossomal	12.3	Manoproteínas	Dano na membrana plasmática
<i>Trichosporon pullulans</i>	CBS 2535	ND	dsRNA	ND	ND	ND
<i>Trichosporon pullulans</i>	CBS 2533	ND	dsRNA	ND	ND	ND
<i>Trichosporon pullulans</i>	CBS 2532	ND	dsRNA	ND	ND	ND
<i>Williopsis mrakii</i>	IFO 0895	HM -1	-	10.7	β-glicana	ND
<i>Williopsis mrakii</i>	NCYC 500	K-500	-	5	β-glicana	Aumento da permeabilidade de íons na MC ^a
<i>Williopsis saturnus</i>	IFO 0117	HYI	Cromossomal	9.5	ND	ND
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	412	KT412	dsRNA	10	Manoproteínas	ND

*Não determinado

^aMembrana celular

Biotipagem de microrganismos de importância clínica utilizando o sistema *killer*

Uma das formas de se realizar estudos epidemiológicos de dispersão de patógenos em ambientes hospitalares, ou onde se faça necessário o controle de infecção, é pela discriminação intra-específica (biotipagem) desses microrganismos em subgrupos (biotipos). Para esses fins, muitos métodos moleculares podem ser empregados, tais como o polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP), polimorfismo da amplificação randômica ou aleatória do DNA (RAPD), amplificação de seqüências repetitivas (SSRs) e de micro-satélites (PEREZ *et al.*, 2001; SCHÜLLER *et al.*, 2004). Dos métodos fenotípicos, resistotipagem, auxanotipagem, enzimatipagem e susceptibilidade a bacteriocinas são os mais utilizados (JARLOV, 1999; MULLER *et al.*, 1999; SLOOS *et al.*, 2000). Biotipagem de microrganismos em pequenos laboratórios geralmente são realizados por padrões de susceptibilidade antimicrobiana (antibiograma por discos de difusão), principalmente pela facilidade de execução e eficácia do resultado. O sistema *killer*, baseado em padrões de sensibilidade à toxina ou KSPs, pode representar uma ferramenta simples, de baixo custo, sensível e reprodutível para discriminação de microrganismos de importância clínica em laboratórios com poucos recursos tecnológicos (BUZZINI *et al.*, 2007).

O primeiro uso de leveduras *killer* para discriminação inter ou intra-específica de microrganismos foi descrito para isolados de *Candida albicans*, demonstrando ser uma ferramenta epidemiológica de grande valor na identificação de casos presuntivos de infecções hospitalares (POLONELLI *et al.*, 1983; BUZZINI *et*

al., 2007). Posteriormente, o sistema *killer* foi aplicado em outras leveduras e também fungos patogênicos, tais como *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *S. cerevisiae*, *Pseudallescheria boydii*, *Penicillium camemberti* e *Aspergillus niger* (FANTI *et al.*, 1989; BUZZINI & MARTINI, 2000; BUZZINI & MARTINI, 2001; BUZZINI *et al.*, 2003; BUZZINI *et al.*, 2004).

Seguindo descrições que o fenômeno *killer* poderia ser efetivo também para microrganismos procarióticos, mesmo que não pelos mecanismos de reação envolvendo ligação com receptores de glicana, manana ou quitina, o método foi testado para diferenciar agentes etiológicos da nocardiose (*Nocardia asteroides*, *Nocardia farcinica* e *Nocardia nova*) e também contra bactérias gram-positivas patogênicas da família *Micrococcaceae* (cocos gram positivos catalase positivos) e micobactérias, agrupando em subgrupos cepas suspeitas de terem mesma origem clínica (IZGU & ALTINBAY, 1997; BUZZINI *et al.*, 2007).

Embora o procedimento de biotipagem usando os padrões de sensibilidade às toxinas *killer* apresente várias facilidades, conflitos resultantes quanto à dificuldade de padronizar a técnica vêm sendo relatados, principalmente quanto à quantidade de toxina secretada pela levedura *killer*, a possível má-interpretação de alguma inibição do crescimento não relacionada com a atividade *killer* ou ainda a não detecção de halos inibitórios muito pequenos. Uma das formas de solucionar o problema referente à quantificação de toxina secretada ou disposta no bioensaio seria a utilização de toxina parcialmente ou totalmente purificada, ou ainda a padronização do inóculo da cepa produtora. Quanto à má-interpretação dos resultados, a utilização sempre de

padrões e também a digitalização das placas, utilizando softwares de edição, reduzem as chances de erro neste caso (BUZZINI *et al.*, 2007).

Micocinas de importância biotecnológica

Nos últimos anos, inúmeras aplicações potenciais para o fenômeno *killer* têm sido descobertas. A aplicação de leveduras micocinogênicas como agentes antifúngicos, marcadores epidemiológicos para discriminação intraespecífica de cepas patogênicas, agentes de biocontrole ou como linhagens iniciadoras de processos fermentativos tem crescido consideravelmente. Diversas leveduras com atividade micocinogênica tiveram suas toxinas isoladas, purificadas e testadas quanto ao seu potencial uso em processos industriais, destacando-se:

- A micocina produzida pela cepa *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 vem sendo testada como um agente biopreservante na superfície de uvas frescas e de sucos de uva processados contra determinadas espécies de leveduras deterioradoras (CIANI & FATICHENTI, 2001). Sua toxina purificada e caracterizada vem sendo utilizada no início de processos fermentativos do vinho, impedindo o surgimento de cepas contaminantes de *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* capazes de re-fermentar o produto após a finalização do processo industrial (COMITINI *et al.*, 2004).
- A micocina produzida pela cepa *Pichia membranifaciens* CYC1106 vem sendo testada como um agente de biocontrole do fungo *Botrytis cinerea*, um microrganismo prejudicial para a maioria das plantas herbáceas, tornando-se

uma alternativa potencial aos métodos químicos convencionais para a prevenção deste fungo (SANTOS & MARQUINA, 2004). Seu mecanismo de ação foi totalmente elucidado, desde seu sítio de ligação (β -1,6-glicana) na parede celular da célula sensível até o mecanismo de extravasamento celular pela membrana plasmática (SANTOS *et al.*, 2000).

- SANTOS *et al.* (2002) também caracterizaram uma micocina produzida pela cepa *Debaryomyces hansenii* CYC1021, com específica ação sobre *Candida boidinii* IGC3430. Seu sítio de ligação, sua fórmula estrutural, bem como suas características físico-químicas também foram determinadas.
- A zigocina é uma micocina purificada da cepa *Zygosaccharomyces bailii*, que possui efeito antagonista contra diversos fungos patogênicos e fitopatogênicos. Sua atividade, comparada aos antifúngicos azólicos convencionais, apresentou melhores resultados em concentrações menores que a usada para os fármacos (WEILER & SCHMITT, 2003).
- A atividade micocinogênica da toxina secretada pela cepa *Williopsis saturnus* DBVPG4561 contra *C. glabrata* e *Pichia guillermondii* foi relatada por Buzzini *et al.* (2004). Esta micocina mostrou-se mais eficiente que os antifúngicos azólicos e poliênicos, inclusive na temperatura corporal, sendo então considerada uma promissora droga de ação sistêmica em quadros clínicos de fungemia.
- Outra linhagem de *Williopsis*, da espécie *W. mrakii*, produz uma micocina denominada HMK, de 10kDa, com alta estabilidade a temperatura e a pH

extremos, exibindo um amplo espectro contra diferentes espécies de leveduras. Esta micocina, aplicada como agente de biocontrole no processo de fabricação de iogurtes, apresentou melhores resultados que os conservantes usuais disponíveis no mercado (LOWES *et al.*, 2000).

- GUYARD *et al.* (2002) purificaram uma micocina (85 kDa) com rápido efeito fungicida secretada também por *W. mrakii*, com amplo espectro de atividade sobre patógenos fúngicos humanos. A toxina se mostrou inativa em linhagens mutantes de *S. cerevisiae* deficientes na produção glicana na parede celular, indicando que esse polissacarídeo constitui o alvo para ação dessa toxina.
- Um decapeptídeo, sintetizado a partir da seqüência gênica de uma micocina secretada por uma cepa de *Pichia anomala* (Pa-KT), exerce uma forte atividade antifúngica contra cepas patogênicas de *C. albicans* e *C. neoformans*. Experimentos avaliando o grau de resposta imunológica à ação da toxina administrada sob via sistêmica vêm demonstrando a ação específica dessa nova droga, representando hoje uma das grandes descobertas de micocinas ou toxinas *killer* com ação benéfica a saúdes humana (CENCI *et al.*, 2004). No Brasil, em experimentos *in vitro* e *in vivo* (testes histopatológicos em fígado e pulmão humanos e também em camundongos) com cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, esse decapeptídeo apresentou uma significativa redução da infecção, principalmente quando em associação com antifúngicos convencionais (TRAVASSOS *et al.*, 2004).

- IZGU *et al.* (2005) caracterizaram uma micocina secretada pela levedura *Pichia anomala* NCYC 434 com um amplo efeito inibitório sobre isolados industriais de *S. cerevisiae*. Experimentos de inibição competitiva sobre os prováveis ligantes primários na parede celular da célula sensível à toxina *killer* revelaram β -(1,3)-glicana como o receptor. A toxina exerce um efeito fungicida em 2h de tratamento, representando um forte candidato para aplicações no biocontrole de processos fermentativos.
- IZGU *et al.* (2006) caracterizaram uma micocina secretada pela levedura *Pichia anomala* NCYC 432 com um efeito inibitório para uma variedade de leveduras, inclusive espécies patogênicas de *Candida*. A caracterização bioquímica da toxina demonstra uma glicoproteína com massa molecular de 47 kDa e estável em valores de pH de 3 a 5 e de temperatura de no máximo 37°C.
- IZGU *et al.* (2007), trabalhando novamente com o isolado *P. anomala* NCYC 434 descreveram a caracterização de uma nova toxina denominada de “panomicocina” ou K5, uma glicoproteína de 49 kDa com uma atividade exo- β -1,3-glicanase testada e ativa contra 41 isolados de dermatófitos. A “panomicocina” demonstrou um interessante potencial como agente antifúngico em isolados de infecções superficiais, cutâneas e subcutâneas, principalmente quando comparada com a ação de agentes antifúngicos tradicionais.

- KESZTHELYI *et al.* (2006) caracterizaram a micocina FC-1 secretada pela levedura basidiomicética *Filobasidium capsuligenum*, que possui uma grande eficácia contra isolados oportunistas de *C. neoformans*. As cepas sensíveis, representando oito subtipos moleculares (VNI-IV and VGI-IV) do complexo *C. neoformans*, tiveram seu perfil celular e integridade nuclear, após tratamento com a toxina FC-1, analisados por citometria de fluxo, revelando um provável mecanismo de ação da toxina como ionófora, sem ação sobre o ciclo celular ou impedindo a formação da parede celular. Em bioensaios de competição, os resultados sugeriram como provável receptor primário de ligação e efeito da toxina a β -1,6-glicana.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Bioprospecção de leveduras *killer* com potencial para aplicação na biotipagem de microrganismos de interesse clínico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar dentre leveduras depositadas na Coleção de Culturas de Leveduras do Departamento de Microbiologia da UFRGS, leveduras com fenótipo *killer*.
2. Identificar as leveduras *killer* selecionadas por métodos fenotípicos convencionais e por métodos moleculares.
3. Avaliar a característica *killer* das leveduras selecionadas em relação ao material genético codificante.
4. Avaliar o potencial biotecnológico das leveduras *killer* selecionadas para uso em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos.
5. Analisar o mecanismo de ação de toxinas *killer* selecionadas através da observação das células sensíveis por microscopia óptica (MO) e por microscopia eletrônica por varredura (MEV).

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Prospecção das leveduras *killer*

1.1.1 Culturas de leveduras

As culturas de leveduras e fungos semelhantes a leveduras utilizadas para avaliar a presença do fenótipo *killer* foram obtidas da Coleção de Culturas de Leveduras do Departamento de Microbiologia da UFRGS, onde estão depositados isolados de substratos de origem animal, como leite *in natura*, leite de cabra *in natura*, queijo e requeijão, e de origem vegetal, como filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*, filoplano de bromélias e frutos.

1.1.2 Culturas de cepas sensíveis

As cepas sensíveis utilizadas nos ensaios de atividade micocinogênica foram cepas patogênicas de leveduras e linhagens patogênicas e multirresistentes de cocos gram-positivos. As leveduras patogênicas foram mantidas em tubos com Ágar GYMP e Ágar YEPG (anexo 1) inclinado a 4°C e cobertos por óleo mineral estéril. Os cocos gram-positivos são isolados clínicos oriundos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-UFRGS) e do Hospital Santa Casa de Porto Alegre, gentilmente fornecidos pelo Dr. Pedro Alves d'Azevedo. Estes foram mantidos a -20°C em dupla camada de *skim milk*, meio recomendado para manutenção desse grupo de bactérias.

1.1.3 Teste de triagem para detecção de linhagens com fenótipo *killer*

O teste de triagem de leveduras micocinogênicas foi realizado de acordo com BUZZINI & MARTINI (2000). Células de leveduras patogênicas foram cultivadas por 48h a 22°C em ágar YEPG, para a obtenção de células metabolicamente ativas, e ressuspendidas em água destilada até uma concentração celular de 10^5 células/mL sendo posteriormente semeadas em superfície, com auxílio de *swab* estéril, em placas contendo Ágar YM-MB (Anexo 1). Culturas puras de leveduras potencialmente micocinogênicas foram inoculadas em caldo YEPG e incubadas a 22°C por 48h, sendo posteriormente semeadas no ágar YM por replicador de microrganismos. As placas, contendo cada uma 25 leveduras potencialmente micocinogênicas, foram incubadas a 22°C por 72h. As cepas foram consideradas micocinogênicas quando o crescimento esteve envolto por uma zona de inibição do microrganismo sensível, onde não ocorre o crescimento da cepa sensível, e uma zona azul adjacente à zona de inibição, indicando morte celular. O indicador da atividade micocinogênica é a zona azul de células mortas envolvendo a zona de inibição. A zona de inibição foi mensurada, através de uma régua milimetrada, para cada cepa sensível.

1.2 Identificação das leveduras *killer* pelas características fenotípicas

As culturas isoladas foram identificadas por características macromorfológicas (morfologia colonial, presença de balistosporos) micromorfológicas (características celulares, formação de ascósporos), bioquímicas (testes de fermentação, testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogenadas) e por fim fisiológicas (produção de

urease, termotolerância, osmotolerância, produção de compostos amilóides), de acordo com BARNETT *et al.* (2000).

1.3 Confirmação da identificação fenotípica através da análise de seqüenciamento de regiões do rDNA

Para a extração de DNA, as leveduras selecionadas para os testes de identificação molecular foram esgotadas em placas de Petri, com meio ágar Sabouraud, onde foram incubadas por 48h a 25°C. Depois de selecionadas as colônias isoladas, estas foram inoculadas em 0,5 mL de tampão de lise (NaCl 1 M; Tris-HCl pH 8,0 1 M; EDTA 0,5 M pH 8,0; SDS 10%) e incubadas por uma hora a 65°C. Em seguida, adicionou-se 1 volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e as amostras foram centrifugadas por 3 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde o DNA foi precipitado com isopropanol p.a. e centrifugado por 15 min a 13000 rpm. O DNA foi lavado em etanol a 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µL de tampão Tris-EDTA.

Após esta etapa, o DNA extraído foi tratado com a enzima RNase A (por 30 minutos a 37°C) e amplificado utilizando os primers NL₁-5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' e NL₄-5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3' (O'DONNELL, 1993), específicos para a região D1/D2 do gene 26S do rDNA e de acordo com condições de amplificação propostas por KURTZMAN & ROBNETT (1998) e utilizadas por FUENTEFRIA *et al.* (2006). A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o kit *DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing* (MegaBACE) e empregando o seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham

Biosciences). As sequências foram obtidas usando o programa phred/phrap/consed (<http://www.phrap.org>) e analisadas no programa BLAST [Nucleotide-nucleotide BLAST \(blastn\)](#) (Altschul *et al.* 1997), disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. O alinhamento das sequências de DNA foi obtida através do programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). As árvores filogenéticas foram construídas pela análise Neighbour-Joining utilizando o programa MEGA, version 3.0 (Kumar *et al.*, 2001).

1.4 Caracterização do genótipo *killer*

1.4.1 Caracterização do material genético extracromossomal

O material genético extraído, das linhagens selecionadas para os testes de caracterização do genótipo *killer*, foi analisado após eletroforese em gel de agarose 1,2%. A caracterização desse material como DNA plasmidial, dsRNA ou ssRNA foi realizada utilizando a digestão com as enzimas RNase A (Sigma) e S1 nuclease (Sigma) de acordo com GOLUBEV *et al.* (2003). Cinco microlitros dos ácidos nucléicos totais foram tratados com 0,5 μL de RNase (Sigma) na concentração de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, acrescido de 4,5 μL de água ultra-pura e incubado por 30 min a 37⁰C, ou com 0,5 μL S1 nuclease (Sigma) em 4,0 μL de água ultra-pura e 0,5 μL tampão 10 X S1 e, incubado por 30 minutos a 37⁰C. Após o tratamento enzimático, o material tratado foi observado numa corrida eletroforética em gel de agarose 1,2%.

1.4.2 Testes de cura do fenótipo *killer*

O teste de cura avaliou a capacidade de perda da característica micocinogênica em leveduras *killer* com material extracromossomal após a exposição contínua da célula produtora a condições de estresse. Neste experimento foram utilizadas elevadas temperaturas de incubação como estratégia estressante para a célula, de acordo com a temperatura máxima de crescimento constatada nos testes fenotípicos de identificação. Repiques semanais das linhagens micocinogênicas incubadas na sua temperatura máxima de crescimento durante o período de um mês, para após então ser avaliado se houve alteração da sua capacidade de produção da toxina, se permaneciam as bandas extracromossomais e por fim se permaneciam com imunidade à toxina anteriormente secretada (GOLUBEV & SHABALIN, 1994; SOARES & SATO, 1999; KLASSEN & MEINHARDT, 2002, GOLUBEV *et al.*, 2003).

1.5 Otimização da composição de um meio de cultura ideal para produção da micocina

1.5.1 Levedura selecionada

A cepa KYQU89 da espécie nova *Trichosporon insectorum* foi selecionada devido ao seu inédito espectro de atividade contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos de interesse clínico.

1.5.2 Pré-seleção dos compostos carbonados, nitrogenados e minerais

Nove diferentes fontes de carbono disponibilizadas a uma concentração de 10 g/L (galactose, ribose, xilose, maltose, glicerol, celobiose, lactose, inositol e N-acetil-

glicosamina), duas fontes de nitrogênio também a uma concentração de 5 g/L (lisina e extrato de carne) e 8 minerais distintos adicionados em uma concentração de 2 g/L ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; K_2SO_4 ; Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4) foram escolhidos para os testes de triagem para a otimização da forma de cultivo para a produção de toxinas *killer* para a cepa de *T. insectorum* KYQU89. As formulações foram realizadas substituindo os componentes químicos correspondentes definidos do meio YM líquido (0,3% extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1% de glicose tamponado com pH 4,2 com tampão citrato 0,05M). Inicialmente, foi otimizada a fonte de carbono, onde se substituiu a glicose separadamente por cada um dos nove carboidratos e selecionou-se o meio mais apropriado para a produção da toxina. A partir do meio selecionado (M1) foram realizadas a substituição pontual das fontes nitrogenadas. A partir do segundo meio selecionado (M2) foram realizadas separadamente as adições de cada um dos oito minerais ao meio de cultura, avaliando-se a diferença de atividade.

1.5.3 Determinação do pH e temperatura ótima de cultivo para produção da micocina

As condições ótimas de temperatura e pH para a produção da micocina *in vitro* da cepa de *T. insectorum* KYQU89 foi pesquisada em placas de Petri com o meio YM modificado com diferentes pHs (3,0 – 6,0, com intervalos de 0,5) e para diferentes temperaturas de incubação (22 – 30°C, com intervalos de 2°C), conforme o protocolo descrito por FUENTEFRIA *et al.* (2004) e IZGU & ALTINBAY (2004).

1.6 Inóculo, cultivo e determinação da atividade *killer*

Os inóculos de 10^6 UFC/mL foram adicionados em cada nova formulação preparada. O meio foi preparado e semeado de acordo com as condições de temperatura, tempo e pH observadas como as ideais. Para avaliar a atividade *killer* da cepa de *T. insectorum* cultivada foi realizada a técnica de doseamento em placa, de acordo com o item 1.1.3, utilizando como cepas sensíveis *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC28957 e *C. gattii* C40.

1.7 Avaliação do potencial das leveduras prospectadas para a utilização em biotipagem de microrganismos

1.7.1 Biotipagem de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Após o ensaio *killer*, conforme descrito no subitem 1.1.3, utilizando uma régua milimetrada, a zona de inibição foi mensurada em milímetros para cada cepa sensível. A matriz quantitativa de dados (QDM) foi obtida substituindo os valores numéricos brutos dos halos inibitórios em letras, de acordo com o tamanho do halo de inibição (i.e. A: nenhum halo; B: 1-4mm; C: 4-10mm; D: 11-15mm; E: 16-20mm; F: 21-25mm; G: 26-30mm; H: >31mm). Todos os dados numéricos representam a média de três determinações distintas ($P < 0.01$). A avaliação estatística dos dados foi obtida por ANOVA.

Para a avaliação da eficácia do método de *fingerprint* QDM por padrões de sensibilidade à toxina *killer*, um dendograma foi construído usando a distância normalizada Euclidiana sobre a matriz de dados gerada pela QDM, com o software

estatístico de livre acesso na web R Package, version 4,0 and Phylip, version 3,57. O método de clusterização de dados *Neighbor joining* foi usado para obter um dendograma final, reamostrado 1000 vezes. O dendograma consenso foi obtido pelo programa CONSENSUS da PHYLIP software.

1.7.2 Biotipagem de *Staphylococcus epidermidis*

Após o ensaio killer, conforme descrito no subitem 1.1.3, e também se valendo de uma régua milimetrada, a zona de inibição foi mensurada em milímetros em cada cepa sensível. Os dados representam a média de três valores determinados separadamente ($p < 0.01$). A avaliação estatística dos dados foi obtida por ANOVA. A presença (1) e a ausência (0) de cada característica *killer* em cada uma das cepas testadas foi primeiramente plotada em uma matriz binária de dados (BDM). A BDM foi então convertida em uma matriz tripla de dados (TDM) agrupando os dados binários em triplets. Cada triplet recebeu um código de 1 a 8, combinando todos os possíveis rearranjos. Finalmente, a matriz quantitativa de dados (QDM) foi obtida substituindo os valores numéricos brutos dos halos inibitórios em letras, de acordo com o tamanho do halo de inibição (i.e. A: 0 - 4mm; B: 5 - 8mm; C: 9 -12mm; D: >12mm). O poder discriminatório da BDM, TDM e QDM foi calculado utilizando índices estatísticos específicos para mensurar a tipagem e diversidade de microrganismos: Índice de Simpson's (λ) e Índice de Hunter e Gaston's (D).

Para a avaliação da eficácia do método de *fingerprint* QDM, um dendograma foi construído usando o Método Parsimonioso de Wagner com múltiplos estágios,

pelo programa PHYLIP package DNAPARS (*maximum parsimony*), version 3.57c. O dendograma final foi reamostrado 1000 vezes. O dendograma consenso foi obtido utilizando o programa CONSENSUS from PHYLIP software.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Prospecção das leveduras *killer*.

Quinhentos e noventa e cinco leveduras isoladas de queijo, requeijão, leite de vaca, leite de cabra, folhas de bromélias, folhas de *Hibiscus rosa-sinensis* e frutos foram submetidas ao teste de triagem para avaliar a presença de atividade *killer* ou micocinogênica contra dois isolados de importância clínica: *Candida glabrata* ATCC 2001 e *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* ATCC 28957. Deste método de triagem, detectou-se 48 leveduras com atividade micocinogênica, que tiveram sua atividade inibitória mensurada em Ágar YM com azul de metileno (Figura 2, Tabela 2).

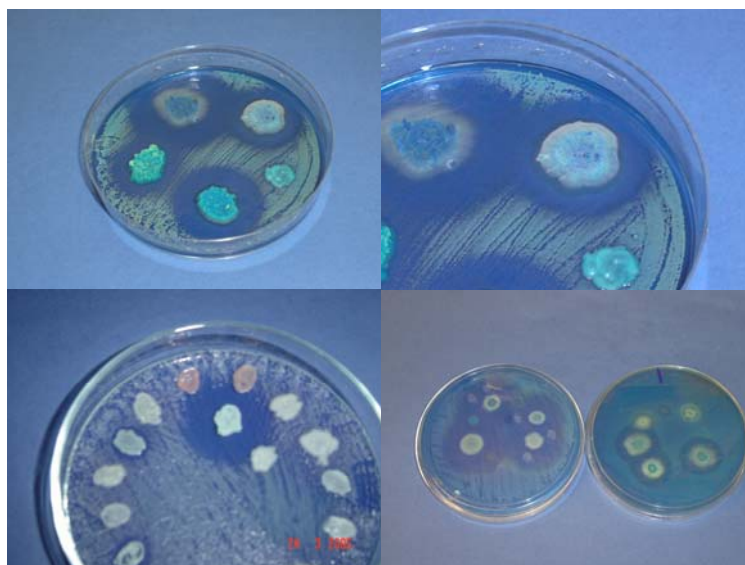


Figura 2. A figura apresenta os halos típicos de inibição observados nos testes de triagem em Ágar YM-MB para a detecção do fenótipo *killer*.

Tabela 2. Listagem de leveduras isoladas de diferentes substratos e pertencentes à Coleção de Culturas de Leveduras do Departamento de Microbiologia da UFRGS realçando as que apresentaram a característica *killer* contra as leveduras sensíveis *C. glabrata* ATCC2001 e/ou *C. neoformans* ATCC28957.

QU (Cepas isoladas de queijo)			LC (cepas isoladas de Leite e queijo de Cabra)		LV (cepas isoladas de Leite de Vaca)		BI (cepas isoladas de folhas de Bromélias)					HB (cepas isoladas de folhas de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>)		Cepas isoladas de Frutas
QU01	QU51	QU101	LC01	LC54	LV01	LV65	BI1	BI70	BI125	BI201	BI250	HB07	HB61	CAQ02
QU02	QU52	QU102	LC02	LC60*	LV02*	LV68	BI2	BI71	BI126	BI202	BI251	HB08	HB62A	CAQ03
QU03	QU53	QU103*	LC03	LC61	LV04	LV69	BI4	BI72	BI127	BI203	BI252	HB10	HB63	UVA01
QU04	QU54	QU104	LC04	LC62	LV06	LV70	BI5	BI73	BI128	BI204	BI253	HB11A	HB64*	UVA02
QU05	QU55	QU105	LC05	LC63	LV08	LV71	BI6	BI76	BI129	BI205	BI254	HB11B	HB66	BAN02
QU06	QU56	QU106	LC06	LC64	LV09	LV72	BI9	BI77	BI130	BI206	BI255	HB12A	HB67	
QU07	QU57	QU107	LC07	LC65	LV10	LV74	BI10	BI78	BI131	BI207	BI256	HB12B	HB68A	
QU08	QU58	QU108	LC08	LC66	LV12*	LV75	BI12	BI79	BI132	BI208	BI257	HB13	HB68B	
QU09	QU59	QU109	LC09	LC67	LV13	LV76	BI14	BI80	BI133	BI209	BI258	HB14	HB69	
QU10	QU60*	QU110	LC10	LC69	LV14	LV78	BI15	BI81	BI134	BI210	BI259	HB15	HB70	
QU11	QU61*	QU111	LC11	LC70	LV15	LV79	BI16	BI82	BI135	BI211	BI261	HB16*	HB71	
QU12	QU62*	QU112*	LC12	LC72	LV16	LV81	BI17	BI83	BI136	BI212	BI262	HB17A	HB73	
QU13	QU63	QU113	LC13	LC74	LV20	LV82	BI18	BI84	BI137	BI213	BI263	HB17B	HB74	
QU14	QU64	QU114	LC14	LC75	LV22*	LV83	BI20	BI85	BI138	BI214	BI264	HB18	HB75	
QU15	QU66*	QU115	LC15	LC76	LV23	LV84	BI21	BI87	BI139	BI215	BI265	HB19	HB76A	
QU16	QU67	QU116	LC17	LC78	LV25	LV86	BI23	BI88	BI140	BI216	BI266	HB20	HB76C*	
QU17*	QU68	QU117	LC18	LC79	LV26	LV90	BI24	BI89	BI141	BI217	BI267	HB21A*	HB78A	
QU18*	QU69	QU118	LC19	LC80	LV27	LV91*	BI25	BI90	BI142	BI218	BI268	HB21B	HB78C	
QU19*	QU70	QU119	LC20	LC81	LV28	LV92	BI26	BI91	BI143	BI219	EI01	HB22	HB79	
QU20	QU71	QU120	LC21	LC83*	LV29	LV93	BI31	BI92	BI144	BI220	EI02*	HB23	HB80	
QU21	QU72*	QU121	LC22	LC85	LV30	LV95	BI32	BI93	BI145	BI221	EI03	HB24A	HB83	
QU22	QU73*	QU122	LC23	LC87	LV31	LV96	BI34	BI94	BI146	BI222	EI04	HB24B	HB85A	

QU23	QU74	QU123	LC24	LC88	LV34	LV98	BI35	BI95	BI149	BI223	E105	HB25	HB85B
QU24	QU75	QU124	LC25		LV35	LV99	BI38	BI96	BI150	BI224		HB26A	HB85C
QU26*	QU76	QU125	LC26		LV36*	LV100	BI39	BI97	BI151	BI225		HB26B	HB87
QU27	QU77	QU126	LC27		LV37	LV101	BI40	BI99	BI152	BI226		HB27A	HB88*
QU28*	QU78	QU127*	LC28		LV38	LV102*	BI41	BI100	BI153	BI227		HB27B	HB89
QU29	QU79	QU128	LC29		LV41	LV103	BI42	BI101	BI154	BI228		HB28*	HB90
QU30*	QU80	QU129	LC30		LV43	LV104	BI43	BI102	BI156	BI229		HB29	HB91*
QU31*	QU81	QU130	LC31		LV44	LV105	BI44	BI103	BI157	BI230		HB30	HB94
QU32	QU82	QU131	LC32		LV45	LV106	BI45	BI104	BI158	BI231		HB31*	
QU33	QU83*	QU132	LC33		LV46	LV111	BI46	BI105	BI167	BI232		HB34	
QU34	QU84	QU133*	LC34		LV47	LV112	BI47	BI107	BI168	BI233		HB37	
QU35	QU85	QU134*	LC35		LV55	LV113	BI48	BI108	BI169	BI234		HB41	
QU36	QU86	QU135	LC36		LV56	LV114	BI49	BI109	BI170	BI235		HB43	
QU37*	QU87	QU136	LC37		LV58	LV115	BI50	BI110	BI171	BI236		HB44	
QU38	QU88*	QU137	LC38		LV59	LV116	BI51	BI111	BI172	BI237		HB45*	
QU39	QU89*	QU138	LC39		LV61		BI52	BI112	BI173	BI238		HB47	
QU40*	QU90	QU139*	LC40		LV64		BI53	BI113	BI174	BI239		HB48	
QU41	QU91	QU140	LC42				BI56	BI114	BI179	BI240		HB49	
QU42	QU92		LC43				BI57	BI115	BI180	BI241		HB51	
QU43	QU93		LC45				BI60	BI116	BI181	BI242		HB53	
QU44	QU94		LC46				BI61	BI117	BI182	BI243		HB54A	
QU45*	QU95		LC47				BI63	BI118	BI183	BI244		HB54B	
QU46	QU96		LC48				BI64	BI119	BI195	BI245		HB55*	
QU47	QU97		LC49				BI65	BI120	BI197	BI246		HB57	
QU48	QU98		LC50				BI67	BI121	BI198	BI247		HB58	
QU49*	QU99*		LC51				BI68	BI122	BI199	BI248		HB60A	
QU50	QU100*		LC52				BI69	BI123	BI200	BI249*		HB60B	
139 aislados			73 aislados		74 aislados		215 aislados					84 aislados	5 aislados
28 Killer (20%)			2 Killer (3%)		6 Killer (8%)		2 Killer (1%)					10 Killer (12%)	0 Killer

* leveduras que apresentaram atividade *killer* contra ao menos uma das duas cepas sensíveis testadas.
Total de isolados testados para verificar a presença do fenômeno *killer*: **595** isolados
Cepas detectadas: **48** cepas *Killer* detectadas* (8,07%)

Tabela3. Dados quantitativos do halo inibitório nos testes de triagem das cepas com melhor perfil killer (com inibição positiva em ambas as cepas sensíveis de triagem).

Levedura <i>Killer</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	^a ATCC2001	ATCC28957
KYQU100	>15mm*	>15mm
KYQU83	>15mm	>15mm
KYQU134	3mm	>15mm
KYQU88	>15mm	>15mm
KYQU89	>15mm	>15mm
KYQU72	>15mm	>15mm
KYQU45	>15mm	>15mm
KYQU31	>15mm	>10mm
KYQU139	>15mm	>15mm
KYQU127	>15mm	>15mm
KYLC83	>15mm	>15mm
KYLC60	>15mm	>15mm
KYBI249	>10mm	>15mm
KYEi02	>15mm	>15mm
KYQU61	3 mm	6 mm
KYQU112	6 mm	6 mm
KYQU99	6 mm	6 mm
KYQU62	3 mm	3 mm
KYQU66	3 mm	3 mm
KYQU73	6 mm	3 mm
KYQU26	3 mm	3 mm
KYQU103	6 mm	3 mm
KYQU28	3 mm	3 mm
KYQU30	3 mm	3 mm
KYQU37	3 mm	3 mm

KYQU49	3mm	3 mm
KYQU133	3 mm	3 mm
KYQU40	6 mm	3 mm
KYQU18	3 mm	3 mm
KYQU19	3 mm	3 mm
KYQU11	3 mm	3 mm
KYQU17	3 mm	3 mm
KYLV91	>15 mm	>15mm
KYLV12	3 mm	3 mm
KYLV02	3 mm	3 mm
KYLV102	6 mm	6 mm
KYLV22	6 mm	3 mm
KYLV36	3 mm	3 mm
KYHB55	3 mm	>10mm
KYHB88	3 mm	>10mm

^aATCC – American Type Culture Collection

* Halo de inibição: Distância entre a borda da colônia e o fim do halo de inibição

Dentre os 48 isolados com fenótipo *killer*, 75% (36 isolados) eram de alimentos lácteos e 25% (12) de fontes ambientais, especificamente plantas, o que demonstra que substratos mais ricos em carboidratos são nichos mais propícios para leveduras com esse fenótipo. Uma das razões já levantadas por GANTER & STARMER (1992) para essa diferença de população *killer* nos diversos nichos seria que em substratos ricos em açúcar haveria uma melhor condição de nutrientes para suportar energeticamente a custosa produção da toxina, possibilitando a predominância de espécies com fenótipo *killer* na seleção natural. Embora as leveduras *killer* isoladas das folhas do *Hibiscus rosa-sinensis* tenham sido de maior

número do que isolados de leite de vaca e leite de cabra, seu potencial antimicrobiano é bem inferior, quando testadas nas duas cepas sensíveis padrões. Tanto nos isolados de alimentos quanto de substratos ambientais houve um maior predomínio de leveduras *killer* com características ascomicéticas, o que está de acordo com a literatura. Entretanto, leveduras basidiomicéticas predominam em condições de habitat diferentes dos isolados ascomicéticos, geralmente suportando condições de temperatura, ressecamento e escassez de nutrientes, o que provavelmente tornaria indispensável adicionar um gasto metabólico a mais para produzir uma toxina de imposição ecológica nesses nichos (GANTER & STARMER, 1992). Houve um predomínio de isolados *killer* no queijo artesanal comparado ao leite de cabra (incluindo queijo de cabra) e de vaca *in natura*. Em suma, de acordo com os nossos resultados, quando comparados índices de frequência de isolamento de linhagens *killer*, parece que substratos lácteos são o mais indicado para a prospecção de linhagens com interesse industrial pelo fenótipo *killer*, ao contrário do que reporta a literatura, segundo a qual substratos naturais poderiam ser mais adequados para o isolamento de cepas produtoras de enzimas ou metabólitos com aplicações biotecnológicas (GANTER & STARMER, 1992; MAGLIANI *et al.*, 1997; GOLUBEV, 1998; GOLUBEV, 2006).

Uma das prováveis razões para que somente 8% dos isolados apresentassem a característica *killer* poderia ser a limitação da metodologia utilizada, onde somente foi testada a atividade contra duas leveduras sensíveis, *C. glabrata* (uma levedura ascomicética) e *C. neoformans* (levedura basidiomicética). Embora o número de isolados leveduriformes utilizados na triagem tenha sido adequado (595 isolados),

existe uma necessidade de se testar um número maior de cepas sensíveis, e não somente duas, ou seja, mais espécies de leveduras, como também fungos filamentosos dimórficos, fungos filamentosos não-dimórficos, outros eucariotos e procaríotos. Provavelmente, neste grupo de isolados haveria mais cepas com perfil *killer* interessante, principalmente se o alvo for cepas de nichos ecológicos semelhantes, como fitopatógenos ou contaminantes de alimentos, o que inclusive poderia ter permitido a detecção de mais isolados *killer* basidiomicéticos (GOLUBEV, 2006).

Das 48 linhagens detectadas com perfil antagonista, 40 foram primeiramente selecionadas por possuírem atividade contra ambas as cepas sensíveis testadas (Tabela 3). Entretanto, somente 32 isolados que apresentaram espectro de ação sobre mais do que os dois isolados sensíveis padrões (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*) foram destacados para testes de confirmação taxonômica e caracterização genética, para que a partir de então fossem selecionados aqueles considerados ideais para formar os painéis de biotipagem de microrganismos (Tabela 4).

2.2 Identificação por características fenotípicas e confirmação através do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S do rDNA.

A taxonomia convencional de leveduras nem sempre alcança uma identificação correta, não somente em nível de espécie, mas às vezes também quanto ao gênero. Por esse motivo, a biologia molecular vem sendo cada vez mais usada como uma importante ferramenta auxiliar na identificação de leveduras,

principalmente de espécies com difícil visualização de características micromorfológicas essenciais para identificação, como a visualização de esporos. Além disso, é uma ferramenta indispensável na análise filogenética de leveduras (KURTZMAN & ROBNETT, 1998). O rDNA (Anexo 2) é muito empregado em estudos taxonômicos devido à presença de regiões codificantes e não-codificantes, que evoluem em diferentes taxas, e também pelo fato dos ribossomos estarem presentes em todos os organismos, a partir de uma origem evolutiva comum. A região gênica do rDNA possui as seguintes estruturas na disposição 5'-3': a região transcrita espaçadora externa (ETS), o gene 18S, a região transcrita espaçadora interna (ITS1), o gene 5,8S, uma segunda região espaçadora interna (ITS2) e o gene 26S. Este último gene apresenta as seqüências menos conservadas, em relação aos genes 18S, 5,8S e 5S, sendo a região de escolha para estudos de filogenia de espécies e grupos taxonômicos mais relacionados. A região D1/D2 do 26S rDNA de grande parte das leveduras conhecidas encontra-se seqüenciada e observou-se que essa região é capaz de diferenciar quase todas as espécies de leveduras testadas, visando estudos de taxonomia (KURTZMAN & ROBNETT, 1998).

Os 32 isolados selecionados tiveram a identificação fenotípica, já previamente realizada por LANDELL *et al.*, (2006), LANDELL (2005) e SPANANBERB *et al.*, (2005) realizada novamente e posteriormente confirmada pelo método de sequenciamento. A identificação convencional e molecular dos isolados *killer* está apresentada na Tabela 4. A correta identificação, em nível de espécie, foi obtida em 28% (9 isolados) dos casos, especificamente nas espécies de *Candida catenulata*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces unisporus*. A

confirmação apenas em nível de gênero foi verificada em 54% (17 isolados) dos casos, entretanto o erro de identificação do isolado foi verificado em 19% (6 isolados) dos casos, com o acerto apenas de especificidade ao filo dos isolados (todos ascomicéticos).

2.3 Identificação de uma espécie nova de levedura *killer*

Os resultados dos testes morfológicos e fisiológicos indicaram que o isolado KYQU89, pertencente ao gênero *Trichosporon*, é claramente distinguível das outras espécies do gênero, como visto nas Tabela 1 e Figura 1 (artigo 1) espécie nova *Trichosporon*. Árvores filogenéticas baseadas nas seqüências D1/D2 do gene 26S rDNA e nas seqüências do gene 18S rDNA localizam essa nova espécie no clado ovoides do gênero *Trichosporon*. A seqüência de DNA na região D1/D2 foi diferente filogeneticamente das espécies *Trichosporon faecale*, *T. asteroides*, *T. asahii* e *T. japonicum* em mais de duas substituições, que é significativo para diferenciar espécies do mesmo gênero (FELL *et al.*, 2000). Além disso, a diferença nos resultados bioquímicos justifica a proposta de uma nova espécie, *T. insectorum*.

Fenotipicamente essa nova espécie é claramente distinguível das outras espécies deste clado pela inabilidade de assimilar o lactato e também por ter um lento crescimento a 42^oC (ver Tabela 1, artigo 1). As outras espécies do clado que não são hábeis para assimilar esse carboidrato, *T. lactis* e *T. caseorum*, possuem temperatura máxima de crescimento entre 35^oC e 37^oC, respectivamente (MIDDELHOVEN *et al.*, 2004).

O perfil *killer* da cepa KYQU89 foi analisado contra um total de 100 isolados de *C. neoformans* / *C. gattii*, com inibição de 96% destes. Os quatro isolados que não foram inibidos por esta levedura pertencem à espécie *C. gattii*. O fenômeno *killer* já foi reportado por outras espécies do gênero *Trichosporon* (GOLUBEV, 2006), parecendo ser uma característica comum deste gênero. Vários autores têm relatado a inibição de isolados de *C. neoformans* ou seu teleomorfo *Filobasidiella neoformans* por leveduras *killer* (BOEKHOUT & SCORZETTI, 1997; BUZZINI & MARTINI, 2000; CENCI *et al.*, 2004; CRISEO *et al.*, 1999; FUENTEFRIA *et al.*, 2006); entretanto, poucos mencionaram o antagonismo contra um largo número de cepas sensíveis como neste estudo.

Para confirmar a relação genética entre o isolado KYQU89 e as duas linhagens isoladas pela Prof(a) Meredith Blackwell (Louisiana State University), BG02-7-20-011B-1-2 e BG02-6-9-2, foi realizada a tipagem molecular por M13 PCR *fingerprinting*, pois cepas da mesma espécie apresentam o mesmo perfil com este par de primers (SAMPAIO *et al.*, 2001). Os padrões polimórficos de bandas gerados pela amplificação foram idênticos como mostra a Figura 3 (manuscrito 1). A análise filogenética, idênticas sequências de D1/D2 e 18S rDNA e também semelhante perfil *killer* confirmar à hipótese que estes três isolados são da mesma espécie. O fato de que a cepa KYQU89 ter sido isolada de queijo artesanal e as cepas BG02-7-20-011B-1-2 e BG02-6-9-2 terem sido isoladas de estômago de artrópodes, hipotetizam a possibilidade de vetorização dessa espécie em locais com condições higiênicas precárias onde predominam esses insetos.

2.4 Caracterização do genótipo *killer*

2.4.1 Caracterização das moléculas codificantes para o fenótipo *killer* e avaliação do método de cura:

A eletroforese em gel de agarose do material genético dos isolados selecionados para confirmação da identificação molecular demonstrou em algumas cepas bandas em adição ao material cromossomal, o que segundo a literatura poderia representar seqüências responsáveis pela codificação do fenótipo *killer* existente nesses isolados (GOLUBEV, 2006). A caracterização da presença desses elementos extracromossomais é de grande importância no estudo do fenômeno *killer*, principalmente devido a sua já bem definida função de conferir a atividade *killer* em determinadas espécies de leveduras. Dos 32 isolados selecionados, 18 apresentaram material extracromossomal, como mostra a Tabela 4, sendo que, de acordo com os tratamentos enzimáticos com RNase e S1 nuclease, todos são provavelmente RNA fita dupla, já que foram degradados apenas com a RNase (géis representativos nas Figuras. 3, 4 e 5). Por exclusão, consideramos que os isolados que não apresentaram seqüências extracromossomais possuem codificação do seu fenótipo *killer* por genes nucleares. Sabendo que nos relatos atuais da literatura não constam isolados de *K. lactis* ou *K. marxianus* com ausência de seqüências extracromossomais envolvidas com a expressão da ação *killer*, provavelmente a metodologia escolhida para a detecção de material extracromossomal teve maior

precisão para dsRNA, mas menor na visualização de plasmídeos, característica relacionada presente nessas duas espécies.

Os testes de cura do fenótipo *killer* foram realizados em três cepas da espécie *T. coremiiforme* e na cepa KYQU89 da espécie nova *T. insectorum*. O perfil micocinogênico foi eliminado pelo crescimento na temperatura máxima de cada isolado onde os clones não-*killer* representaram cerca de 100% da população sobrevivente; além disso, a maioria dessas cepas demonstrou ser sensível ao próprio fenótipo *killer* exercido pela cepa selvagem. Entretanto nenhuma cepa mostrou-se neutra, ao contrário do que geralmente é detectado na literatura com testes de cura (GOLUBEV, 2006). Nas Figuras 3, 4 e 5, a presença de dsRNA em cepas selvagens (não submetidas aos testes de cura) pode ser visualizada. A sua ausência em cepas submetidas ao teste de cura (Figuras 3 e 4) indicam uma possível relação com a atividade antimicrobiana exercida pela célula hospedeira, visto que quando curadas, as cepas *killer* perderam sua capacidade de expressar seu fenótipo inibidor, como descrito também por outros autores em outras espécies de leveduras *killer* (GOLUBEV & SHABALIN, 1994; SOARES & SATO, 1999; KLASSEN & MEINHARDT, 2002, GOLUBEV *et al.*, 2003). As cepas de *T. coremiiforme* de queijo de cabra KYLC60 e KYLC83 apresentaram várias bandas de material extracromossômico que, quando curadas, causaram a perda da característica antagonista.

Tabela 4. Identificação fenotípica e molecular das 32 leveduras *killer* selecionadas para os testes de biotipagem.

CEPA	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	PRESEÇA DE MATERIAL GENÉTICO EXTRACROMOSSOMAL
KYQU100	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon faecale</i>	Ausente
KYQU83	<i>Trichosporon loubieri</i>	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	dsRNA
KYQU134	<i>Candida sake</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	Ausente
KYQU88	<i>Trichosporon loubieri</i>	<i>Trichosporon faecale</i>	dsRNA
KYQU89*	<i>Trichosporon loubieri</i>	<i>Trichosporon insectorum</i> DQ411821	dsRNA
KYQU72	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon faecale</i>	dsRNA
KYQU45	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon faecale</i>	Ausente
KYQU31	<i>Candida catenulata</i>	<i>Candida catenulata</i>	dsRNA
KYQU139	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon japonicum</i>	dsRNA
KYQU127	<i>Candida</i> sp.	<i>Candida catenulata</i>	Ausente
KYLC83	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	dsRNA
KYLC60	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	dsRNA
KYBI249	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Trichosporon japonicum</i>	dsRNA
KYEi02	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Trichosporon japonicum</i>	dsRNA
KYQU112	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon faecale</i>	dsRNA
KYQU99	<i>Candida</i> sp.	<i>Kluyveromyces lactis</i>	dsRNA
KYQU37	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ausente

KYLV91	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Trichosporon ovóides</i>	dsRNA
KYLV22	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Ausente
KYLV102	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Candida catenulata</i>	Ausente
KYQU61	<i>Candida restingae</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>	dsRNA
KYQU11	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	dsRNA
KYLV36	<i>Candida</i> sp.	<i>Candida parapsilosis</i>	Ausente
KYQU73	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ausente
KYQU26	<i>Candida catenulata</i>	<i>Candida catenulata</i>	Ausente
KYQU103	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Ausente
KYQU28	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	dsRNA
KYQU30	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	dsRNA
KYQU49	<i>Saccharomyces unisporus</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>	Ausente
KYQU133	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	dsRNA
KYQU18	<i>Candida catenulata</i>	<i>Candida catenulata</i>	Ausente
KYLV02	<i>Candida</i> sp.	<i>Candida parapsilosis</i>	Ausente

* Espécie nova identificada (Artigo 1)

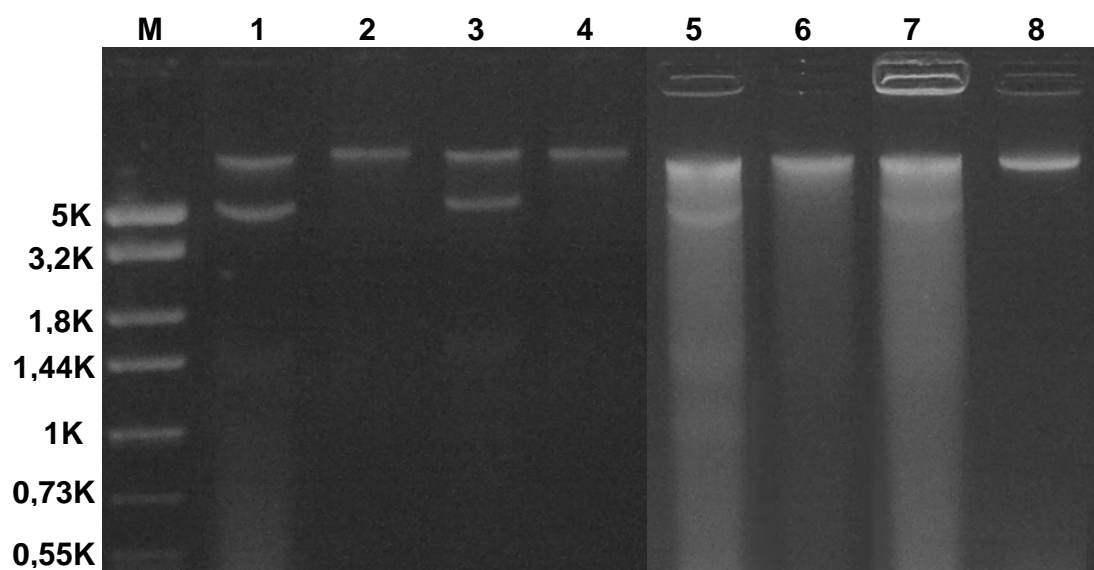


Figura 3. Gel de agarose (1,2%) dos ácidos nucléicos totais tratados com RNase A e S1 Nuclease da cepa micocinogênica selvagem e curada *Trichosporon coremiforme* KYQU83 e *Trichosporon insectorum* KYQU89, 1. KYQU83 sem tratamento; 2. KYQU83 com Rnase A; 3. KYQU83 com S1 Nuclease; 4. KYQU83 curada; 5. KYQU89 sem tratamento; 6. KYQU89 com Rnase A; 7. KYQU89 com S1 Nuclease; 8. KYQU89 curada;

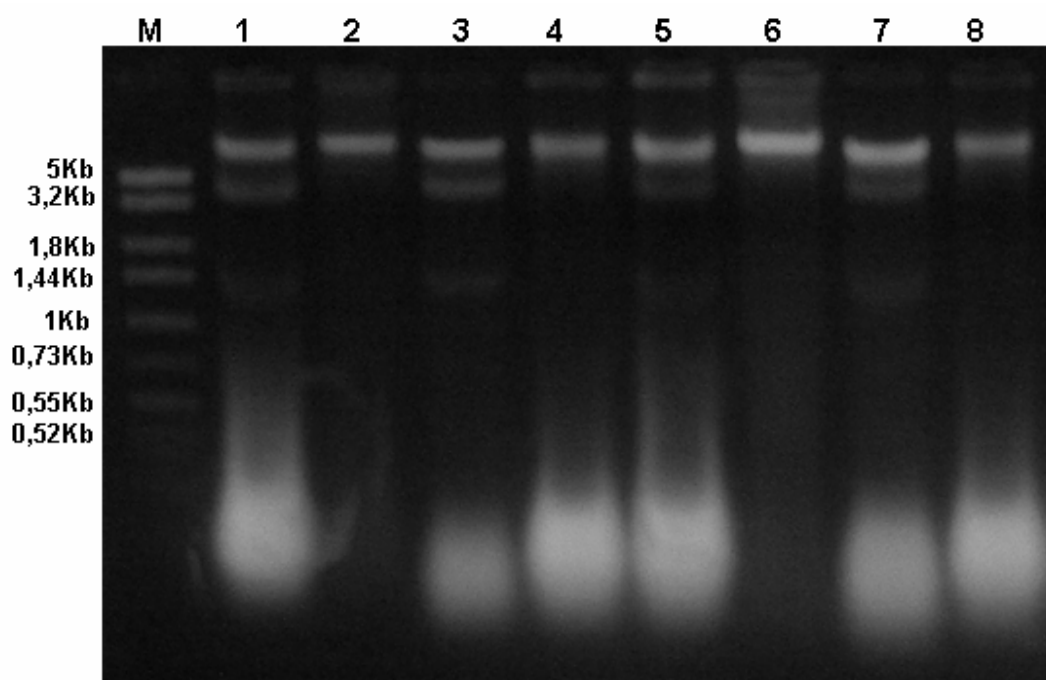


Figura 4. Gel de agarose (0,8%) dos ácidos nucléicos totais tratados com Rnase A e S1 Nuclease das cepas micocinogênicas selvagem e curada *Trichosporon coremiiforme* KYLC83 e KYLC60: M. Marcador; 1. KYLC83 sem tratamento; 2. KYLC83 com Rnase A; 3. KYLC83 com S1 Nuclease; 4. KYL83 curada; 5. KYLC60 sem tratamento; 6. KYLC60 com RNase A; 7. KYLC60 com S1 Nuclease; 8. KYLC60 curada;

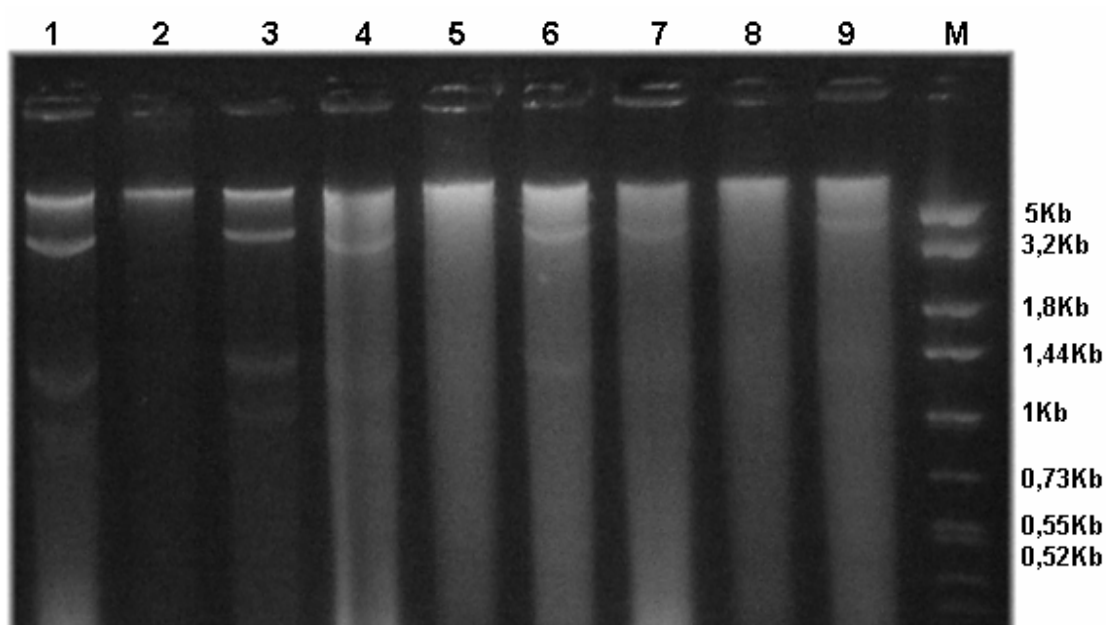


Figura 5. Gel de agarose (1,2%) dos ácidos nucléicos totais tratados com RNase A e S1Nuclease das cepas micocinogênicas selvagens de *Trichosporon faecale* KYQU88, *Trichosporon faecale* KYQU72 e *Trichosporon japonicum* KYQU139, 1. KYQU88 sem tratamento; 2. KYQU88 com RNase A; 3. KYQU88 com S1 Nuclease; 4. KYQU72 sem tratamento; 5. KYQU72 com RNase A; 6. KYQU72 com S1 Nuclease; 7. KYQU139 sem tratamento; 8. KYQU139 com RNase A; 9. KYQU139 com S1 Nuclease;

2.5 Otimização da composição de um meio de cultura e das condições de temperatura e pH ideais para produção da micocina KT89:

Os efeitos da composição do meio, pH e temperatura foram investigados para a produção da toxina *killer* de *Trichosporon insectorum* KYQU89. Não foi verificada uma diferença na quantidade de atividade *killer* produzida em diversas composições e variações dos meios de cultura testados, o que evidencia que a bioquímica de produção desta toxina pela cepa KYQU89 não requer exigências nutricionais específicas, mas apenas condições de fornecimento de unidade básicas de açúcar e de aminoácidos. Entretanto, um desenho experimental totalizando 11 ensaios foram desenvolvidos para estudar os efeitos do pH e temperatura de incubação que interferem na produção da toxina pela levedura *in vivo* (Figuras 5 e 6) demonstrando que a temperatura ótima de atuação fica entre 26 até 40^oC e o pH ótimo entre 4,0 e 5,4. De acordo com a literatura (SANTOS *et al.*, 2002; GOLUBEV, 2006) cepas *killer* com potencial biotecnológico para utilização de seus metabólitos de interesse necessitam possuir condições de cultivo simples, resistindo a situações não favoráveis, com variações de pH e temperatura. A cepa KYQU89 além de ter um amplo espectro de atuação contra leveduras, fungos filamentosos e procariotos de interesse clínico, possui essas condições, possibilitando uma ótima perspectiva de estabilidade nas condições necessárias para os processos de purificação.

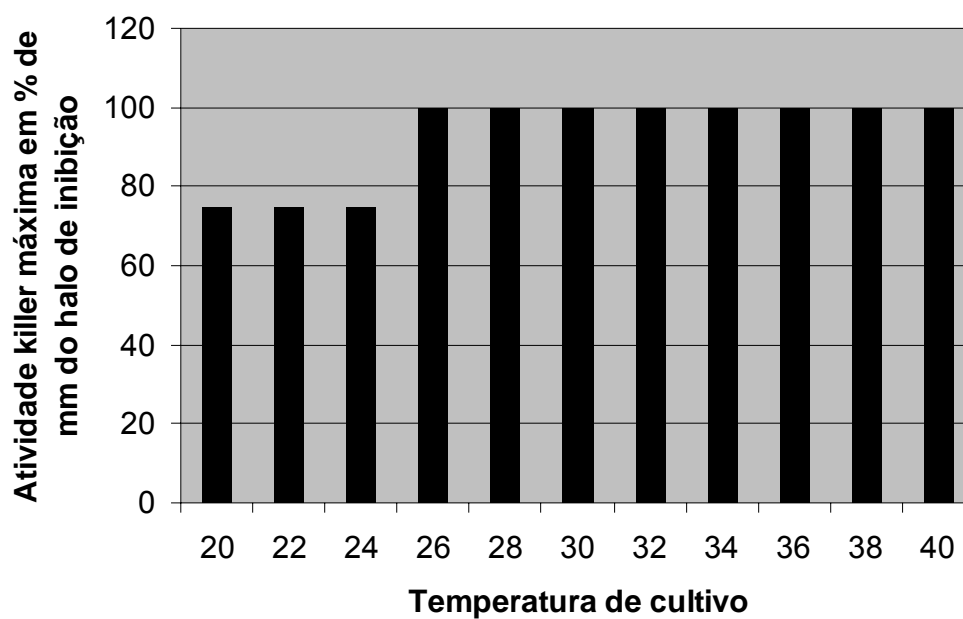


Figura 6. Ensaio das condições ótimas de temperatura para a produção de micocina pela cepa KYQU89 no meio YM. Cem por cento da atividade *killer* representa um halo de inibição maior ou igual a 15mm.

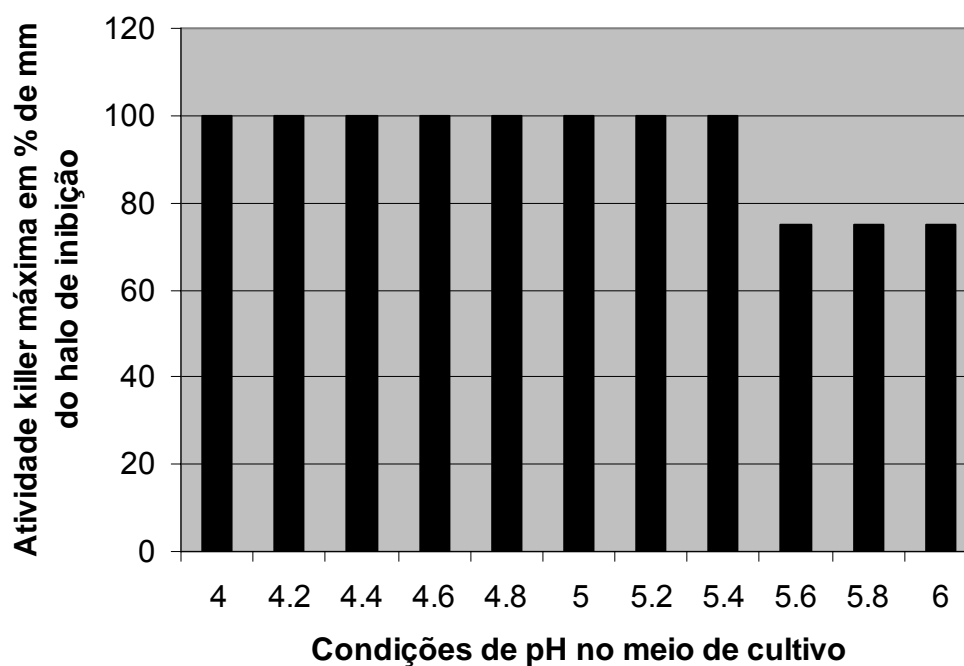


Figura 7. Ensaio das condições ótimas de pH para a produção de micocina pela cepa KYQU89 no meio YM. Cem por cento da atividade *killer* representa um halo de inibição maior ou igual a 15mm.

2.6 Biotipagem de microrganismos pelo sistema *killer*

2.6.1 Biotipagem de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Todos os isolados de *Cryptococcus* foram inibidos ao menos por oito leveduras *killer* que compuseram o painel de tipagem (ver Tabela 1, artigo 2), sendo que 65% por mais de 17 leveduras, 82% por mais de 15. Entretanto, 14% foram inibidos por todas as cepas *killer* do painel. *Trichosporon japonicum* KYQU139 inibiu todos os isolados de *Cryptococcus*, enquanto *T. faecale* KYQU45, KYQU88 e *T. coremiiforme* KYLC83 inibiram ao menos um. Os padrões de sensibilidade para as toxinas *killer* demonstraram haver uma correlação entre as cepas KYQU45, KYQU112, KYQU100 e KYLC83 e a variedade das cepas de *Cryptococcus*. *C. neoformans* var. *grubii* teve maior sensibilidade, ao contrário dos isolados de *C. gattii* que apresentaram casos de total resistência. Os isolados de *C. neoformans* var. *neoformans* apresentaram tanto resistência como sensibilidade intermediária (halos A, B e C, artigo 2).

Não há correlação entre os padrões de sensibilidade e a variedade, nem tipo molecular e nem espécies dos *Cryptococcus* testados ao menos no caso citado no parágrafo acima para a utilização de um painel com as cepas KYQU45, KYQU112, KYQU100 e KYLC83. Entretanto, um dendrograma baseado numa matriz quantitativa de dados (QDM) (Figura 1, artigo 2) indica que há uma completa discriminação das cepas de *Cryptococcus* por meio do método de biotipagem *killer*.

Uma importante constatação deste trabalho é a capacidade de cinco cepas *killer* inibirem ao menos 99% de todos os isolados de *Cryptococcus*, demonstrando haver na toxina secretada uma promissora fonte de um novo agente antifúngico

objetivando o controle deste microrganismo, visto que o tratamento da criptococose pelos antifúngicos convencionais possui várias desvantagens devido aos efeitos adversos e ao alto grau de resistência (MAXWELL *et al.*, 2003; VADASZ *et al.*, 2000).

De acordo com a Figura 1 (artigo 2) não houve correlação entre os isolados obtidos de diferentes pacientes, hospitais, tipos moleculares e áreas do estado do Rio Grande do Sul. Entretanto, a discriminação das cepas tipificadas pelo sistema molecular através da biotipagem *killer* demonstrou ser uma boa união de métodos, visto que todas as linhagens foram discriminadas, quando anteriormente permaneciam em grupos. Esta união de ferramentas pode ser fundamental na elucidação de casos de infecções hospitalares envolvendo estudos epidemiológicos para a distinção de possíveis clones de cepas patogênicas disseminadas nestes ambientes.

O método de biotipagem por matriz quantitativa de dados pelos padrões de sensibilidade às toxinas *killer* é uma metodologia fácil e barata que não requer equipamentos sofisticados nem softwares licenciados, sendo apropriada para laboratórios com mínimos recursos, além de servir como controle de qualidade para centros de coleções de cultura como forma de reconhecimento e registro de estirpes.

2.6.2 Biotipagem de *Staphylococcus epidermidis*

Enquanto nenhuma atividade *killer* foi observada em relação aos isolados clínicos de *S. aureus*, todas as cepas clínicas multi-resistentes de *S. epidermidis* foram sensíveis ao menos para uma levedura *killer* incluída no painel selecionado e constituído de 11 linhagens (ver Tabela 1, artigo 3). Esse curto e seletivo painel de leveduras *killer* permitiu a discriminação de 90%, 97% e 100% das cepas sensíveis usando os métodos de matriz binária de dados (BDM), matriz tripla de dados (TDM) e matriz quantitativa de dados (QDM), respectivamente. A correlação entre o número de leveduras *killer* e o número de cepas discriminadas (DS) de *S. epidermidis*, demonstrou que a QDM possui o melhor poder discriminatório, quando comparada com os outros métodos matemáticos (ver Figura 1a, artigo 3). O poder discriminatório foi também observado em acordo com dois índices para mensurar a diversidade; índices de Simpson (λ) e Hunter & Gaston (D), com relação ao número de leveduras *killer* para os três métodos de análise. QDM demonstrou mais altos valores de λ e D que os exibidos pela BDM e TDM, comprovando a QDM como a mais provável ferramenta para analisar e biotipar as bactérias multi-resistentes em estudo.

O dendrograma obtido por variação randômica dos resultados (ver Figura 2, artigo 3) demonstra que ambas as espécies foram agrupadas em dois grandes grupos, o primeiro incluindo a maioria das cepas de *S. epidermidis* e o segundo compreendendo todas as cepas de *S. aureus* e os seguintes isolados de *S. epidermidis* SCN9, SCN136, SCN167, SCN179, SCNunc9 e SCNunc13. A análise do dendrograma expressa também claramente que não houve nenhuma correlação

entre a origem dos isolados clínicos, o perfil de resistência aos antibióticos e a sensibilidade às toxinas *killer*. Baseado no efeito discriminatório obtido com a metodologia de tipagem por leveduras *killer*, sugere-se que os isolados de *S. epidermidis* analisados não possuem correlações epidemiológicas, embora esta hipótese ainda necessite ser mais estudada.

A aplicação das leveduras *killer* como biomarcadores epidemiológicos é uma importante alternativa (ou uma técnica complementar) para os métodos moleculares convencionados como padrão ouro. A facilidade metodológica e o baixo custo desta técnica nestas situações estudadas podem permitir o uso rotineiro em laboratórios microbiológicos com mínimos recursos.

2.7 Descrição da espécie nova *Trichosporon insectorum*

ARTIGO NO PRELO - MYCOLOGICAL RESEARCH (2007)

doi: 10.1016/j.mycres.2007.05.001.

***Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic
basidiomycetous *killer* yeast**

Alexandre M. Fuentefria, Sung-Oui Suh, Melissa F. Landell, Josiane Faganello,
Augusto Schrank, Marilene H. Vainstein, Meredith Blackwell, Patrícia Valente

Accepted Manuscript

Title: *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast

Authors: Alexandre M. Fuentefria, Sung-Oui Suh, Melissa F. Landell, Josiane Faganello, Augusto Schrank, Marilene H. Vainstein, Meredith Blackwell, Patricia Valente



PII: S0953-7562(07)00110-4
DOI: 10.1016/j.mycres.2007.05.001
Reference: MYCRES 267

To appear in: *Mycological Research*

Received Date: 22 September 2006
Revised Date: 13 February 2007
Accepted Date: 8 May 2007

Please cite this article as: Fuentefria AM, Suh S-O, Landell MF, Faganello J, Schrank A, Vainstein MH, Blackwell M, Valente P. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast, *Mycological Research* (2007), doi: 10.1016/j.mycres.2007.05.001

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

1 ***Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer**
2 **yeast**

3
4 Alexandre M. Fuentefria^a; Sung-Oui Suh^b; Melissa F. Landell^c; Josiane Faganello^a;
5 Augusto Schrank^a; Marilene H. Vainstein^{a,c}; Meredith Blackwell^b; Patrícia Valente^{c*}

6
7 ^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

8 ^bDepartment of Biological Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge,
9 LA70803, USA

10 ^c Departamento de Microbiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
11 Rua Sarmiento Leite, 500 sala 158, 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

12
13
14 *Corresponding author. Tel.: +55-051-33163935.

15 E-mail address: patricia.valente@ufrgs.br

16 Corresponding Editor: Teun Boekhout

17 **Summary**

18 Three killer yeasts, isolated from the gut of insects in Panama and artisanal
19 cheese in Brazil, were shown to be related to the Ovoides clade of the genus
20 *Trichosporon*. Sequencing of the D1/D2 region of the LSU rDNA and physiological
21 characterization revealed a distinct taxonomic position in relation to known species of
22 the genus. Conspecificity of the three killer isolates was reinforced by similar M13
23 fingerprinting and killer profiles. We propose a new species in this genus: *Trichosporon*
24 *insectorum*. The type strain is CBS 10422^T (syn. NRRL Y-48120). This anamorphic
25 species produces arthroconidia but not appressoria, and its killer character seems to
26 be associated with dsRNA.

27
28 **Keywords:** *Trichosporon insectorum* sp. nov., yeast.

29
30 **Introduction**

31 *Trichosporon* species are basidiomycetous yeasts (*Hymenomyces*,
32 *Tremelloidae*, *Trichosporonales*) without a known sexual state (Middelhoven *et al.*
33 2004). They are characterized morphologically by production of septate mycelia and
34 arthroconidia, although certain species possess additional morphological characters,
35 such as formation of appressoria or macroconidia (Gueho *et al.* 1992, Middelhoven *et*

1 *al.* 2004). Some species are commonly recognized as opportunistic pathogens *viz.*: *T.*
2 *asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* and *T. ovoides* (Guého *et al.*
3 1998, Sugita *et al.* 1996). Other species are isolated from substrates not related to
4 clinical samples (Middelhoven 2004, Middelhoven *et al.* 2004, Sugita *et al.* 2002a).
5 Several new *Trichosporon* species have been recently described, e.g. *T.*
6 *mycotoxinivorans* isolated from the hindgut of termites (Molnar *et al.* 2004).

7 The genus *Trichosporon* is monophyletic. Based on nuclear base sequencing of
8 the SSU rDNA (Guého *et al.* 1992, Sugita & Nakase 1998) the genus could be divided
9 into three groups of different species, although more groups are recognized in the
10 *Trichosporonales* order (Okoli *et al.* 2006, Takashima *et al.* 2001). Sequence analyses
11 of the D1/D2 region of the LSU rDNA (Guého *et al.* 1998, Fell *et al.* 2000) and ITS
12 region (Scorzetti *et al.* 2002, Sugita *et al.* 1999) supported division of *Trichosporon*
13 species into four clades. Middelhoven *et al.* (2004) proposed the names Gracile,
14 Porosum, Cutaneum and Ovoides to designate these groups. In addition to rDNA base
15 sequencing, traditional physiological characterization and serotyping, *Trichosporon*
16 clades and species can be distinguished by their assimilation of several organic
17 compounds not traditionally used in routine metabolic tests (Middelhoven 2002, 2004),
18 and sequencing of the mitochondrial cytochrome b genes (Biswas *et al.* 2005) and IGS
19 regions (Sugita *et al.* 2002b).

20 In the course of two independent studies, two yeast strains isolated from the gut
21 of beetles in Panama and one from artisanal cheese in Brazil were found to belong to a
22 new species of *Trichosporon*. Here we propose the new species, *T. insectorum*, based
23 on phylogenetic analysis using sequences of the SSU rDNA and the D1/D2 region of
24 LSU rDNA as well as morphological and physiological characteristics. Additional
25 support for conspecificity of the three isolates was provided by similar M13 fingerprints
26 and killer activity.

27 **Materials and Methods**

28 *Strains examined*

29 The strains BG02-6-9-2 (syn. CBS10421; NRRL Y-48121) and BG02-7-20-011B-1-2
30 (syn. CBS 10422^T, NRRL Y-48120^T) were isolated during a study of yeasts associated
31 with the digestive tract of insects at Barro Colorado Island, Panama (Suh *et al.* 2005).
32 The strain KYQU89 (syn. CBS10423, NRRL Y-48122) was isolated from Brazilian
33 artisanal cheese (Landell *et al.* 2006). Cultures were maintained at 4 °C in GYMP (2%
34 glucose, 0.5% yeast extract, 2% malt extract, 0.2% monobasic sodium phosphate, 2%
35

1 agar) agar slants covered with sterile mineral oil or kept frozen in YM broth (1%
2 glucose, 0.3% malt extract, 0.3% yeast extract, 0.5% peptone) with 15% glycerol.

3 4 *Morphological, biochemical and physiological characteristics*

5 Conventional yeast identification based on phenotypic characters was performed
6 according to Yarrow (1998), using the keys provided by Barnett *et al.* (2000) and the
7 computer program YEASTCOMPARE (Ciriello & Lachance 2001).

8 9 *Evaluation of the killer phenomenon*

10 Assessment of killer activity was performed in modified YM agar [YM broth containing
11 15% glycerol, 2% agar and 0.003% methylene blue (Sigma, St Louis), buffered to pH 5
12 with citrate buffer). As sensitive strains, 30 clinical and environmental isolates of
13 *Cryptococcus neoformans* and *C. gatti* were tested against the three *Trichosporon*
14 strains. Strain CBS10423 was further tested against 70 yeasts, including *C.*
15 *neoformans*/*C. gattii* isolates and 27 other yeast strains belonging to several species
16 (e.g., *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. catenulata*, *C.*
17 *krusei*, *C. tropicalis* and *Yarrowia lipolytica*). Overnight grown target cells from sensitive
18 yeasts were suspended in distilled water to a density of 4×10^5 cells ml^{-1} , and were
19 spread on the assay Petri dishes. Yeast killer strains were point inoculated over the
20 sensitive yeast inoculum, and plates were incubated at 25 °C for 72h. The strain was
21 considered to be a killer if there was an evident zone of inhibition of the sensitive yeast
22 around its inoculum.

23 24 *Characterization of the killer phenomenon*

25 Total nucleic acid of strain CBS10423 was isolated as described by Ramos *et al.*
26 (2001) from 3-d-old cultures, separated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel with
27 ethidium bromide and visualized under UV light. Characterization of the high mobility
28 nucleic acid bands was performed by treatment with the enzymes S1 nuclease and
29 RNase, which cleave single-stranded nucleic acids and double-stranded RNA,
30 respectively, according to Golubev *et al.* 2003, followed by 0.8% agarose gel
31 electrophoresis. Enzymatic treatments were carried out for 30 min at 37 °C, as follows:
32 1 unit S1 nuclease (Sigma) and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ RNase (Sigma). Aliquots of 0.1 ml of strain
33 CBS10423 cells diluted in water (10^5 cell ml^{-1}) were spread on YEPD agar (2%
34 glucose, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 2% agar) plates and incubated at 42 °C

1 (maximum growth temperature) for two weeks in order to induce thermal cure. Single
2 colonies were selected at random and assayed for their killer activity. Colonies that lost
3 the killer character had their total nucleic acid extracted and analysed as described
4 above.

5

6 *DNA sequencing and phylogenetic analysis*

7 DNA extraction and amplification of the D1/D2 region of the LSU rDNA were performed
8 for isolate CBS10423 as described in Ramos *et al.* (2001), using the primers NL₁-
9 5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' and NL₄-5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'
10 (O'Donnell 1993). The purified PCR product (100 ng) was used for sequencing with the
11 primers NL1 and NL4. DNA sequencing reactions were performed using a DYEnamic
12 ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE) kit (Amersham Biosciences, New
13 Jersey) and run on MegaBACE 1000 capillary sequencers. DNA sequencing for the
14 other two strains, CBS10421 and CBS10422, was performed as described in Suh *et al.*
15 (2005). Sequences were assembled using phred/phrap/consed (<http://www.phrap.org>)
16 and analysed with the Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) program (Altschul *et al.*
17 1997), available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. DNA sequences were aligned
18 using the CLUSTAL X computer program (Thompson *et al.* 1997) and optimized
19 visually. Phylogenetic trees were constructed using NJ analysis using MEGA version
20 3.0 (Kumar *et al.* 2001). *Cryptococcus humicola* CBS 571 and *Filobasidiella*
21 *neoformans* CBS132 were used as outgroup taxa. BS confidence values were based
22 on 1K replications.

23

24 *M13 PCR fingerprinting*

25 The oligonucleotide of the minisatellite-specific core sequence of the wild-type phage
26 M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') was used as primer for PCR reactions,
27 according to Meyer *et al.* (1999). Thirty-five cycles of 20 s at 94 °C, 1 min at 50 °C and
28 20 s at 72 °C were performed, followed by a single extension cycle at 72 °C for 6 min.
29 Amplified products were separated by electrophoresis in 1.8% agarose gels for 5 h at
30 60 V, and were visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

31

32 **TAXONOMY**

1 **Trichosporon insectorum** A.M Fuentefria, S.O. Suh, M.F. Landell, J. Faganello, A.
2 Schrank, M.H. Vainstein, M. Blackw. & P. Valente **sp. nov.** (Fig. 1–3)

3 MycoBank no.: MBXXXXXX

4

5 *Ety.*: The name *T. insectorum* was chosen in honour of the habitat of the first two
6 strains isolated (CBS10421 and CBS10422).

7

8 In liquido 'YM', post dies 5 ad 25 °C, cellulae ovoideae, ellipsoideae, elongatae, 5–10×3–4 µm, singulae
9 aut binae. Sedimentum formatur. Post unum mensem ad 25 °C, pellicula completa et sedimentum
10 formantur. In agar 'YM', post unum mensem ad 25 °C, cultura crenea, butyracea, margo fimbriata.
11 Arthroconidia, pseudomycelium et mycelium formantur neque appressoria. Glucosum non fermentatur.
12 Glucosum, galactosum, L-sorbosum (exigue), D-glucosaminum (exigue), D-ribosum, D-xylosum, L-
13 arabinosum, sucrosus, maltosus, trehalosus, cellobiosus, salicinum (lente), arbutinum, lactosum,
14 melezitolum (exigue), xylitolum (exigue), inositolum, D-gluconatum, D-glucuronatum, butano-2, 3-diolum
15 (lente), ethanolum, propane-1, 2-diolum (lente), D-glucaratum (lente), glycerolum, acidum succinicum et 2-
16 keto-D-gluconatum assimilantur. D-arabinosum (vel exigue), L-rhamnosum, raffinolum (vel exigue),
17 ribitolum (vel lente), D-mannitolum (vel lente), melibiosum, inulinum, amyllum solubile, D-glucitolum,
18 galactitolum, gluconolactolum, DL-acidum lacticum, citratum, methanolum, acidum quinicum et
19 erythritolum non assimilantur. Aethylaminum (variabile), L-lysinum, cadaverinum et D-tryptophanum
20 (exigue) assimilantur. kali nitratum, sodii nitritum, creatinum, creatininum, glucosaminum et imidazolium
21 non assimilantur. 42 °C crescit neque 45 °C. Ureum finditur. Diazonium caeruleum B positivum. Crescere
22 potest in medio 100 mg ml⁻¹ cycloheximido addito. Materia amyloidea formatur.

23

24 *Typus*: Panama: Barro Colorado Island, isolata a ile *Eurystemys* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae). BG 02-
25 7-20-011B-1-2 (CBS 10422^T—holotypus; NRRL Y-48120 — isotypus) designat stirpem typicam.

26 The yeasts showed the typical morphological characteristics of the genus *Trichosporon*
27 after 4 d at 25 °C in YM broth: cells are ovoidal, ellipsoidal, elongated, 5–10 × 3–4 µm,
28 single or in pairs (Fig. 1A) with sediment formed. After one month at 25 °C a complete
29 pellicle and sediment are present. On YM agar after one month at 25 °C the streak
30 culture is cream-coloured, butyrous with a fimbriate margin. Dalmau plate culture on
31 corn meal agar for 4 d at 25 °C shows development of pseudohyphae and/or septate
32 hyphae (Fig. 1B) and arthroconidia (Fig. 1C). Appressoria are absent. Sexual
33 reproduction was not observed. Physiological characteristics are summarized in Table
34 1.

35

36 *Type*: Panama: Barro Colorado Island, isolated from the gut of *Eurystemys* sp.
37 (*Coleoptera: Scarabaeidae*). (CBS 10422^T—holotype, NRRL Y-48120 — isotype).

38

1 Other specimens examined: **Panama:** Barro Colorado Island, isolated from the gut of
2 *Paxillus leachi* (Coleoptera: Passalidae), BG 02-6-9-2 (CBS10421; NRRL Y-48121)—
3 **Brazil:** Rio Grande do Sul, isolated from artisanal cheese, CBS10423 (NRRL Y-
4 48122).

6 Results and Discussion

7 The results of morphological and physiological tests indicated that the three isolates,
8 CBS10421, CBS10422 and CBS10423, belong to the genus *Trichosporon*, but they
9 were clearly distinguished from all other species of the genus (Table 1, Fig. 1).
10 Phylogenetic trees based on the D1/D2 sequences (Fig. 2) and SSU rDNA sequences
11 (data not shown) placed this new species in the Ovoides clade of the genus
12 *Trichosporon*. The DNA sequences of the D1/D2 region were identical among the three
13 isolates, and they differed from the closely related species *T. faecale*, *T. asteroides*, *T.*
14 *asahii* and *T. japonicum* by more than two substitutions, which is generally considered
15 enough genetic difference to separate species (Fell *et al.* 2000). In addition, differences
16 in the biochemical results support the proposal of the new species, *T. insectorum*.
17 Phenotypically, the new species is clearly distinguished from all species of the Ovoides
18 clade by the inability to assimilate lactate and/or by delayed growth at 42 °C (Table 1).

19 The killer profile of strain CBS10423 was assayed against a total of 100 isolates
20 of *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, showing 96% inhibition of them. The four
21 isolates that were not inhibited by strain CBS10423 belonged to the species *C. gattii*.
22 Strains belonging to clinically relevant *Candida* species were weakly inhibited, while
23 there was no inhibition of *Yarrowia lipolytica* isolates. Assessment of the killer profile of
24 strains CBS10421 and CBS10422 against 30 isolates of *C. neoformans/C. gattii*
25 showed the same results as those obtained with strain CBS10423 (data not shown).
26 The killer phenomenon has already been reported for other *Trichosporon* species
27 (Golubev 2006), and seems to be a common character in the genus. Several authors
28 have reported the inhibition of isolates of *C. neoformans* by killer yeasts (Boekhout &
29 Scorzetti 1997, Buzzini & Martini 2000, Cenci *et al.* 2004, Criseo *et al.* 1999, Fuentefria
30 *et al.* 2006, Morace *et al.* 1984), but few mentioned the inhibition of such a wide variety
31 of isolates as used in the present study.

32 Attempts to cure the killer character of strain CBS10423 by cultivation at the
33 maximum growth temperature resulted in loss of the killer character in approximately
34 10% of the colonies. The cured colonies did not present the smaller nucleic acid bands

1 typical of the original strain when total nucleic acid content was analysed using 0.8%
2 agarose gel electrophoresis, and only presented the low-mobility band corresponding
3 to chromosomal DNA molecules. This loss of the smaller bands was also achieved
4 when the nucleic acid of the original CBS10423 strain was treated with RNase,
5 demonstrating that the bands corresponded to dsRNA. Treatment with S1 nuclease
6 was innocuous. Therefore, the killer character in *Trichosporon insectorum* seems to be
7 associated with dsRNA molecules.

8 M13 PCR fingerprinting was performed with the objective of confirming the
9 genetic relatedness among the isolates obtained from beetle guts and cheese,
10 because strains that belong to the same species have similar M13 fingerprint profiles
11 (Sampaio *et al.* 2001). The fingerprint patterns of isolates CBS10422, CBS10421, and
12 CBS10423 were nearly identical (Fig. 3). The results from the phylogenetic analysis,
13 DNA sequence comparisons, M13 fingerprint profile, and killer pattern support the
14 hypothesis that the three isolates are conspecific.

15 It is tempting to hypothesize that the presence of strain CBS10423 in cheese is
16 due to contamination of arthropod origin, especially because it was isolated from
17 artisanal cheese marketed at stands with poor hygienic conditions. In fact certain mites
18 are well known for their infestation of cheeses, even to the extent that they cause work
19 place allergies (Gorham 1979). However, a connection with beetles in the present case
20 awaits additional information on the ecology of *T. insectorum*. Other members of the
21 Ovoides clade, e.g. *T. caseorum* and *T. lactis*, also have been isolated from cheese
22 (Lopandic *et al.* 2004).

23 24 25 **Acknowledgements**

26 M.B. and S.-O.S. acknowledge support from the National Science Foundation (DEB-
27 0417180) and the use of a DNA sequencing facility supported by a NSF Multiuser
28 Equipment Grant (DBI-0400797) to Robb Brumfield. Donald Windsor and Oris Acevedo
29 helped with the logistics for collecting at the Smithsonian Tropical Research Institute,
30 Barro Colorado Island, Panama. The automated DNA sequencing of strain CBS10423
31 was performed at the facilities of the Brazilian Genome Network at Center of
32 Biotechnology, Cbiot-UFRGS-RS. We acknowledge the assistance of Jonathan Lo who
33 took the photographs.

34

1 References

- 2 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997.
3 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
4 programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- 5 Barnett JA, Payne RW, Yarrow D, 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd
6 edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- 7 Biswas SK, Wang L, Yokoyama K, Nishimura K, 2005. Molecular phylogenetics of the
8 genus *Trichosporon* inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences.
9 *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 5171-5178.
- 10 Boekhout T, Scorzetti G, 1997. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of
11 *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **35**: 147-149.
- 12 Buzzini P, Martini A, 2000. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from Brazilian
13 rain Forest. *Canadian Journal of Microbiology* **46**: 607-611.
- 14 Cenci E, Bistoni F, Mencacci A, Perito S, Magliani W, Conti S, Polonelli L, Vecchiarelli
15 A, 2004. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Cellular Microbiology* **6**:
16 953-961.
- 17 Ciriello CJ, Lachance MA, 2001. *YeastCompare*. University of Western Ontario,
18 London.
- 19 Criseo G, Gallo M, Pernice A, 1999. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus*
20 *neoformans* var. *neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. *Mycoses* **42**:
21 601-608.
- 22 Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A, 2000. Biodiversity
23 and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA
24 D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary*
25 *Microbiology* **3**: 1351-1371.
- 26 Fuentefria AM, Franskoviaki IM, Mercado LW, Ramos JP, Vainstein MH, Valente P,
27 2006. Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates by two
28 Brazilian killer yeasts. *Journal of Basic Microbiology* **46**: 87-93.
- 29 Golubev WI, 2006. Antagonistic interactions among yeasts. In: Rosa CA, Peter G
30 (eds), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 197-219.

- 1 Golubev WI, Pfeiffer I, Churkina LG, Golubeva EW, 2003. Double-stranded RNA
2 viruses in a mycotoxigenic strain of *Cystofilobasidium infirmominatum*. *FEMS Yeast*
3 *Research* **3**: 63-68.
- 4 Gorham JR, 1979. Significance for human health of insects in food. *Annual Review of*
5 *Entomology* **24**: 209-224.
- 6 Guého E, Smith MT, de Hoog GS, Billon-Grand G, Christen R, Batenburg-van der
7 Vegte WH, 1992. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie van*
8 *Leeuwenhoek* **61**: 289-316.
- 9 Guého E, Smith MT, de Hoog GS, 1998. *Trichosporon* Behrend. In: Kurtzman CP, Fell
10 JW (eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 854–872.
- 11 Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M, 2001. MEGA2:molecular evolutionary
12 genetics analysis software. Arizona State University, Arizona.
- 13 Landell MF, Hartfelder C, Valente P, 2006. Identification and enzymatic profile of
14 yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*
15 **34**: 49-55.
- 16 Lopandic K, Sugita T, Middelhoven WJ, Herzberg M, Fell JW, Zelger S, Prillinger H,
17 2004. *Trichosporon caseorum* sp. nov. and *Trichosporon lactis* sp. nov., two
18 basidiomycetous yeasts isolated from cheeses. In: Agerer R., Piepenbring M., Blanz,
19 P. (eds), *Frontiers in Basidiomycota Mycology*. IHW-Verlag, pp.99-116.
- 20 Meyer W, Marszewska K, Amirmostoçan M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani
21 MA, Chindamporn A, Sukroon-Greung S, John MA, Ellis DH, Sorrell TC, 1999.
22 Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by
23 polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA — a
24 pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological
25 survey. *Electrophoresis* **20**: 1790-1799.
- 26 Middelhoven WJ, 2002. Identification of clinically relevant *Trichosporon* species.
27 *Mycoses* **46**: 7-11.
- 28 Middelhoven WJ, 2004. *Trichosporon wieringae* sp. nov., an anamorphic
29 basidiomycetous yeast from soil, and assimilation of some phenolic compounds,
30 polysaccharides and other non-conventional carbon sources by saprophytic
31 *Trichosporon* species. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**: 329-337.

- 1 Middelhoven WJ, Scorzetti G, Fell JW, 2004. Systematics of the anamorphic
2 basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel
3 species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T.*
4 *gamsii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 975-986.
- 5 Molnar O, Schatzmayr G, Fuchs E, Prillinger H, 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans*
6 sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins.
7 *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 661-671.
- 8 Morace G, Archibusacci C, Sestito M, Polonelli L, 1984. Strain differentiation of
9 pathogenic yeasts by the killer system. *Mycopathologia* **84**: 81-85.
- 10 O'Donnell K, 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR., Taylor JW (eds),
11 *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal*
12 *Systematics*. CAB International, Wallingford, pp. 225-233.
- 13 Okoli I, Oyeda CA, Kwon-Chung KJ, Theelen B, Robert V, Groenewald JZ, McFadden
14 DC, Casadevall A, Boekhout T, 2006. *Cryptotrichosporon anacardii* gen. nov., sp. nov.,
15 a new trichosporonoid capsulate basidiomycetous yeast from Nigeria that is able to
16 form melanin on niger seed agar. *FEMS Yeast Research*, in press.
17 DOI:10.1111/j.1567-1364.2006.00164.x.
- 18 Ramos JP, Valente P, de Souza RA, Rosa CA, Leoncini O, 2001. Heteroduplex
19 mobility assay of the D1/D2 region of the 26s rDNA for differentiation of
20 *Saccharomyces* species. *Letters in Applied Microbiology* **33**: 206-210.
- 21 Sampaio JP, Gadanho M, Santos S, Duarte FL, Pais C, Fonseca A, Fell JW, 2001.
22 Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospordium*:
23 *Rhodospordium kratochvilovae* and related anamorphic species. *International Journal*
24 *of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 687-697.
- 25 Scorzetti G, Fell JW, Fonseca A, Statzell-Tallman A, 2002. Systematics of
26 basidiomycetous yeasts: a comparison of large sub-unit D1D2 and internal transcribed
27 spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research* **2**: 495-517.
- 28
- 29 Sugita T, Nakase T, 1998. Molecular phylogenetic study of the basidiomycetous
30 anamorphic yeast genus *Trichosporon* and related taxa based on small subunit
31 ribosomal DNA sequences. *Mycoscience* **39**: 7-13.
- 32

- 1 Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T, Kusunoki T, 1996. Taxonomic studies on clinical
2 isolates from superficial trichosporonosis patients by DNA relatedness. *Japanese*
3 *Journal of Medical Mycology* **37**: 107–110.
- 4 Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, Shinoda T, 1999. Identification of medically relevant
5 *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and
6 construction of a database for *Trichosporon* identification. *Journal of Clinical*
7 *Microbiology* **37**: 1985-1993.
- 8 Sugita T, Takashima M, Nakase T, Ichikawa T, Shinoda T, Nishikawa A, 2002a. A
9 basidiomycetous anamorphic yeast, *Trichosporon terricola* sp. nov., isolated from soil.
10 *Journal of General and Applied Microbiology* **48**: 293-297.
- 11 Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T, 2002b. Sequence analysis
12 of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *Journal of*
13 *Clinical Microbiology* **40**: 1826-1830.
14
- 15 Suh S-O, McHugh JV, Pollock DD, Blackwell M, 2005. The beetle gut: a hyperdiverse
16 source of novel yeasts. *Mycological Research* **109**: 261-265.
- 17 Takashima M, Sugita T, Shinoda T, 2001. Reclassification of the *Cryptococcus*
18 *humicola* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*
19 **51**: 2199-2210.
- 20 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The
21 CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment
22 aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876–4882.
- 23 Yarrow D, 1998. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: Kurtzman CP,
24 Fell JW (eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 77-100.
- 25
- 26 **Figure 1.** Morphology of *Trichosporon insectorum* CBS 10422^T. (A) Various shapes of
27 vegetative cells and arthroconidia grown in YM broth for 4 d at 25 °C. (B) Hyphae on
28 corn meal agar for 4 d at 25 °C. (C) Hyphae disarticulating into arthroconidia on corn
29 meal agar for 4 d at 25 °C. Bars = 10 µm
30

1 **Figure 2.** Phylogenetic tree of *Trichosporon insectorum* sp. nov. and related taxa. The
 2 tree was constructed using the NJ method from D1/D2 26S rDNA sequences. The
 3 numerals represent the confidence level from 1K replicate BS sampling.

4

5 **Figure 3.** PCR-fingerprinting patterns obtained with primers M13 from *Trichosporon*
 6 *insectorum* isolates. Lanes: 1, CBS 10423; 2, CBS 10422; 3, CBS 10421.

7

8 Table 1. Biochemical and physiological characterization of *Trichosporon insectorum*
 9 sp. nov.

Fermentation of carbon compounds

D-Glucose -

Assimilation of carbon compounds

D-Glucose	+	Ribitol	-, D
D-Galactose	+	Xylitol	W
L-Sorbose	W	D-Glucitol	-
D-Glucosamine	W	D-Mannitol	-, D
D-Ribose	+	Galactitol	-
D-Xylose	+	myo-Inositol	+
L-Arabinose	+	D-Glucono-1,5-lactone	-
D-Arabinose	-, W	2-Keto-D-gluconate	+
L-Rhamnose	-	D-Gluconate	+
Sucrose	+	D-Glucuronate	+
Maltose	+	DL-Lactate	-
Trehalose	+	Succinate	+
Cellobiose	+	Citrate	-
Salicin	D	Methanol	-
Arbutin	+	Ethanol	+
Melibiose	-	Propane 1,2 diol	D
Lactose	+	Butane 2, 3 diol	D
Raffinose	-, W	Quinic acid	-
Melezitose	W	D-Glucarate	D
Inulin	-	Glycerol	+
Soluble starch	-	Erythritol	-

Assimilation of nitrogen compounds

Nitrate (potassium)	-
Nitrite (sodium)	-
Ethylamine	V
L-Lysine	+
Cadaverine	+
Creatine	-
Creatinine	-
D-Glucosamine	-
Imidazole	-
D-Tryptophan	W

Growth at

25 °C	+
30 °C	+
37 °C	+
40 °C	+
42 °C	D
45 °C	-

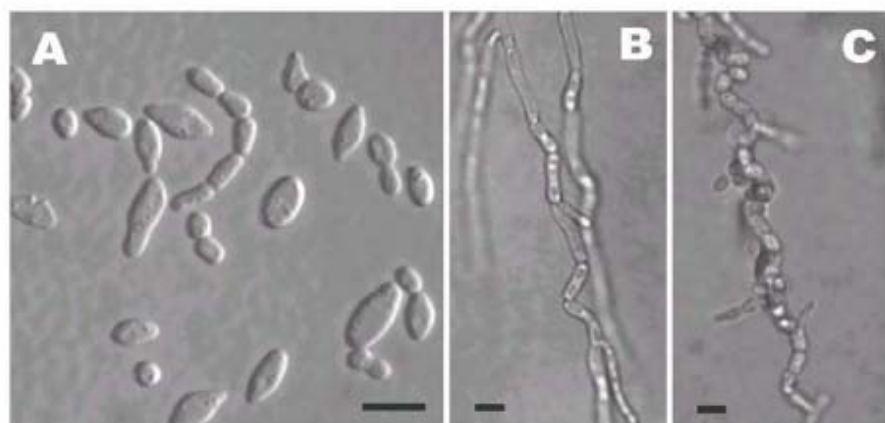
Vitamin requirement

w/o Pantothenate	+
w/o Biotin	-
w/o Thiamin	+
w/o Biotin & Thiamin	-
w/o Pyridoxine	+
w/o Pyridoxine & Thiamine	+
w/o Niacin	+
w/o PABA	+

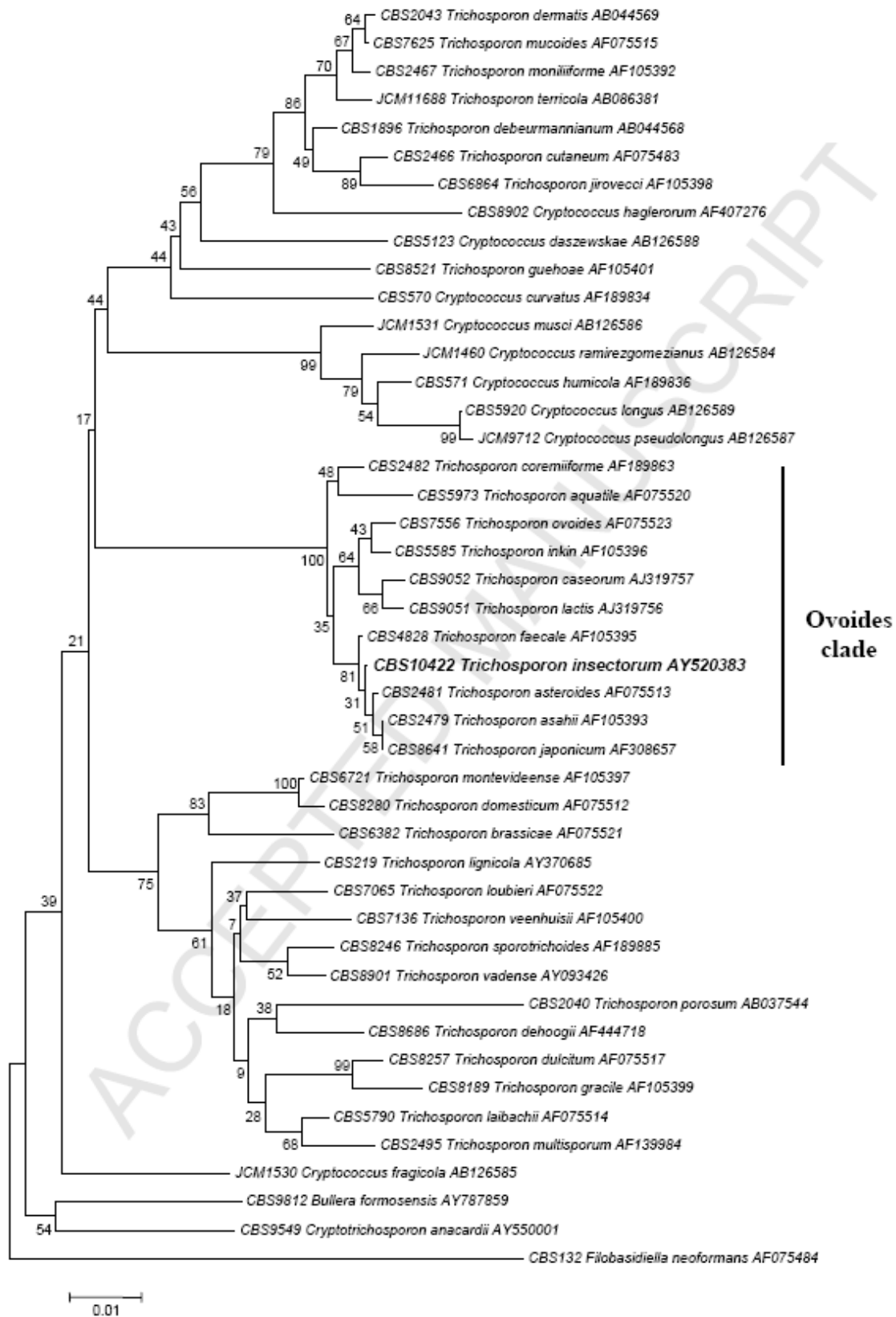
Other additional tests

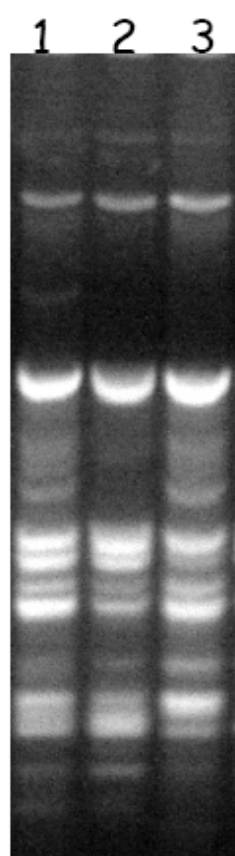
0.01% Cycloheximide	+
1% Acetic acid	-
50% D-Glucose	V
60% D-Glucose	-

	10% Sodium chloride	V
	16% Sodium chloride	-, W
	Starch formation	+
	Urea hydrolysis	+
	Diazonium blue B reaction	+
1	(+) Growth within 21 d; (-) no growth after 21 d; (v) variable response; (D) growth after	
2	21 d or more.	
3		
4	AUTHOR QUERIES	
5	PROVIDE CITY AND STATE FOR: Sigma, Amersham Biosciences	
6	PROVIDE MYCOBANK NO.S	
7	COLLECTOR NAMES AND DATES MISSING FROM TYPE/TYPUS INFORMATION	
8	Lopandic ET AL 2004: PROVIDE CITY FOR PUBLISHER	
9	Okoli ET AL 2006: UPDATE IF POSSIBLE: PUBLICATION INFO AND YEAR OF	
10	PUBLICATION IF 2007	



ACCEPTED





ACCEPTED MANUSCRIPT

2.8 Biotipagem de *Cryptococcus neoformans*

ARTIGO PUBLICADO - *MEDICAL MYCOLOGY* (2007)

**Typing and patterns of cellular morphological alterations in
Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* isolates
exposed to a panel of *killer* yeasts.**

Alexandre M. Fuentefria, Josiane Faganello, Augusto Schrank, Patrícia
Valente, Marilene H. Vainstein

Typing and patterns of cellular morphological alterations in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates exposed to a panel of killer yeasts

ALEXANDRE M. FUENTEFRIA*, JOSIANE FAGANELLO*, FABIANO PAZZINI*, AUGUSTO SCHRANK*†§, PATRÍCIA VALENTE† & MARILENE VAINSTEIN*†§

*Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, †Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ‡Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and §Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are encapsulated basidiomycetous yeasts that cause meningoencephalitis. The action of killer yeasts on the growth of one hundred genotypically characterized *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii*, and *C. gattii* clinical and environmental isolates was evaluated. Killer studies were performed on yeast malt-methylene blue (YM-MB) agar Petri dishes, and a dendrogram was obtained based on a quantitative data matrix using the diameter of the inhibition halo. The cellular morphological characteristics of dead cells within the halo were observed by means of optical and scanning electron microscopy. There was no formation of pores on the cell surface of the sensitive cells in contact with the toxins, at least for *C. neoformans*. The sensitivity patterns of clinical and environmental isolates to the killer toxins demonstrated that there is correlation between killer sensitivity of *Cryptococcus* species or varieties and some of the killer strains. In this case, the isolates were discriminated using the killer sensitivity patterns, and this could be used as a complementary tool to PCR-fingerprinting in epidemiological studies.

Keywords Killer yeasts, typing, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, scanning electron microscopy

Introduction

The *Cryptococcus neoformans* species complex comprises encapsulated basidiomycetous yeasts that are a major cause of fungal meningoencephalitis, mainly in immunocompromised individuals, e.g., AIDS patients [1]. *C. neoformans* was formerly comprised of two varieties, i.e., *C. neoformans* var. *neoformans* (serotypes A, D, and the AD hybrid) and *C. neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C) [2]. The latter was recently raised

to species status, *Cryptococcus gattii* [3]. According to molecular studies based on RFLP analysis and sequencing data, *C. neoformans* serotype A was recognized as a new variety, *C. neoformans* var. *grubii* [4], whereas serotype D was restricted to *C. neoformans* var. *neoformans* [1].

Significant efforts have been invested in molecular typing techniques to attain a level of intraspecific discrimination between *C. neoformans* and *C. gattii* that would be significantly superior to serotyping. Polymerase chain reaction (PCR) fingerprinting and restriction fragment length polymorphism (RFLP) [5], amplified length polymorphism AFLP [6] and partial sequence analyses of the intergenic spacer region (IGS) [7,8] have shown considerable genetic divergence among species and varieties.

AQ1

Received ???; Accepted ???

Correspondence: Marilene Vainstein, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PO Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 33086060; Fax: +55 51 33087309. E-mail: mhv@cbiot.ufrgs.br

In the last years, biotyping procedures based on phenotypic characteristics that could be used as epidemiological markers for differentiating these pathogenic species and varieties have also been developed [9–11]. The killer sensitivity profile was applied by Boekhout and Scorzettini [9], who were able to distinguish four patterns of sensitivity among 129 isolates of *C. neoformans* var. *neoformans* and six among 32 isolates of *C. gattii* using six basidiomycetous killer yeasts.

In the present study we have verified the action of 20 killer yeasts on the growth of 100 genotypically characterized clinical ($n=72$) and environmental ($n=28$) isolates of *C. neoformans* var. *neoformans* ($n=12$), *C. neoformans* var. *grubii* ($n=75$), and *C. gattii* ($n=13$). In addition, we have evaluated the application of the killer sensitivity profile as a typing method and have analyzed the effect of the killer toxins on the cellular morphology of the sensitive cells by means of optical and scanning electron microscopy.

Materials and methods

Strains

The 100 isolates of *C. neoformans* and *C. gattii* strains studied are listed in Table 1. All *Cryptococcus* strains were previously characterized into molecular types by M13 and (GACA)₄ PCR-fingerprinting [12,13]. The killer panel was composed by 20 strains selected from previous screening of 44 non-*Saccharomyces* killer strains obtained from phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* (KYHB), phylloplane of Bromeliads (KYBI), raw milk (KYLK), raw goat milk (KYLK), cheese (KYQU) and fruits (KYF), in Brazil. For molecular identification of the killer yeasts, the D1/D2 domains of the 26S rDNA gene were sequenced using the primers NL₁-5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' and NL₄-5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3' [14]. DNA sequencing reactions were performed using the DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE) kit and run on MegaBACE 1000 capillary sequencers (Amersham Biosciences). Sequences were assembled using phred/phrap/consed (<http://www.phrap.org>) and analyzed with Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) program [15], available in the site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. The killer strains *Kodamaea ohmeri* KYHB55 and KYHB88 were previously identified by sequencing of D1/D2 domains of the 26S rDNA gene [16]. Cultures were maintained at 4°C on glucose-yeast extract-malt extract-phosphate (GYMP; glucose 2%, yeast extract 0.5%, malt extract 2%, monobasic sodium phosphate

0.2%, agar 2%) agar slants covered with sterile mineral oil, and deposited at the yeast culture collection of the Microbiology Department of the Federal University of Rio Grande do Sul.

Killer assay

Overnight grown target cells from *C. neoformans* and *C. gattii* isolates were suspended in distilled water to a density of approximately 10^6 cells/mL and spread on the assay Petri dishes containing yeast-malt methylene blueagar (YM-MB; yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1%, agar 2% and methylene blue Sigma 0.003%, pH 5.5). Inoculum suspensions (10^8 cells/ml) of 24 h grown cells of potential killer yeasts were prepared, imprinted onto the sensitive yeast inoculum by the Steer's replicator, and incubated at 25°C for 3–5 days. The killer activity was considered positive if there was an evident zone of inhibition around the inoculum of the killer strain, surrounded by a crown of dark-blue stained cells. A narrow but clear inhibition zone was interpreted as a weak killer action.

Data matrix typing method

Using a metric ruler, the diameter of the zone of inhibition was measured in millimeters for each sensitive strain. As a result, a quantitative data matrix (QDM) was obtained [17]. All numerical data represent the average value of three separate determinations ($P < 0.01$). Statistical evaluation of the data was obtained by ANOVA. A cluster analysis was performed for estimating the killer typing efficacy using a normalized Euclidean distance matrix based on the QDM data, through the statistical free software R Package, version 4.0 and Phylip, version 3.57. Neighbor joining clustering method was used to obtain the final dendrogram, with a 10,000 times resampling with replacement using a bootstrap procedure. A consensus tree was obtained using the CONSENSUS application from PHYLIP software.

Observation of morphological alterations in *Cryptococcus* cells exposed to the killer toxin

For the observation of morphological alterations *C. neoformans* var. *grubii* (isolates C95, AZ29), *C. neoformans* var. *neoformans* (C76, E14) and *C. gattii* (C40, C20) were used as sensitive strains, and *Trichosporon faecale* (KYQU100, KYQU88 and KYQU45), *Trichosporon japonicum* (KYQU139) and *Trichosporon coremiforme* (KYQU83, KYLC83) as killer yeasts. The test was performed at 30°C for 48 h in separate experiments. The morphology of dead cells within the

Table 1 Quantitative Data Matrix (QDM) concerning the differential growth inhibition halves of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatti* isolates studied

Species/Varieties Strain number	Characteristics	Serotype/Molecular Type	Killer yeasts												
			KYQ100	KYQ101	KYQ102	KYQ103	KYQ104	KYQ105	KYQ106	KYQ107	KYQ108	KYQ109	KYQ110	KYQ111	KYQ112
<i>C. gattii</i>															
(1) AZ13	Parrot droppings	B/VGI	C	D	C	A	E	C	A	A	A	A	A	C	D
(2) AZ14	Parrot droppings	B/VGI	C	E	C	C	E	C	A	A	A	A	A	C	D
(3) C2	Clinical isolate, HIV+	B/VGIII	C	E	C	C	E	C	C	A	A	A	A	C	D
(4) C20	Clinical isolate, HIV+	B/VGIII	B	D	B	A	D	D	B	C	A	A	A	C	D
(5) C40	Clinical isolate, Male	B/VGIII	B	D	B	A	D	D	B	C	A	A	A	C	D
(6) C41	Clinical isolate, Male	B/VGIII	B	D	B	A	D	D	B	C	A	A	A	C	D
(7) C42	Clinical isolate, Male, tumor	B/VGIII	A	D	C	A	E	E	B	C	D	B	A	A	E
(8) C43	Clinical isolate, Female	B/VGIII	C	E	B	C	E	B	C	D	C	D	B	A	A
(9) C44	Clinical isolate, Male, HIV+	B/VGIII	A	B	B	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A
(10) C45	Clinical isolate, Male	B/VGIII	B	D	B	A	D	D	B	C	A	A	A	A	A
(11) C46	Clinical isolate, Female	B/VGIII	B	E	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A
(12) C47	Clinical isolate, Male	B/VGIII	D	D	E	C	D	E	C	C	C	C	C	C	C
(13) C48	Clinical isolate, Male	B/VGIII	D	E	E	E	E	D	E	A	C	A	A	A	E
<i>C. n. var. gattii</i>															
(1) E1	Pigeon droppings	A/VNI	D	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	D	B
(2) E2	Parrot droppings	A/VNI	B	A	A	A	E	B	A	A	A	A	A	D	B
(3) E3	Pigeon droppings	A/VNI	A	A	A	A	E	B	A	A	A	A	A	D	B
(4) E4	Pigeon droppings	A/VNI	A	A	A	A	E	B	A	A	A	A	A	D	B
(5) E9	Pigeon droppings	A/VNI	D	D	G	B	E	B	E	D	D	D	D	E	E
(6) AZ1	Parrot droppings	A/VNI	A	A	D	E	B	F	A	A	A	A	A	D	B
(7) AZ5	Parrot droppings	A/VNI	B	A	F	E	B	B	B	B	B	B	B	D	B
(8) AZ6	Parrot droppings	A/VNI	A	B	D	D	B	B	B	B	B	B	B	D	B
(9) AZ9	Parrot droppings	A/VNI	B	D	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F
(10) AZ10	Parrot droppings	A/VNI	B	B	D	E	B	B	B	B	B	B	B	D	B
(11) AZ15	Parrot droppings	A/VNI	D	D	G	F	F	F	F	F	F	F	F	D	B
(12) AZ16	Parrot droppings	A/VNI	D	B	F	B	D	E	B	D	B	D	B	D	B
(13) AZ18	Parrot droppings	A/VNI	B	D	E	E	B	H	G	A	D	D	D	D	D
(14) AZ19	Parrot droppings	A/VNI	B	D	F	E	A	G	F	A	A	B	F	E	D
(15) AZ24	Parrot droppings	A/VNI	B	D	E	B	H	H	A	A	A	B	F	E	D
(16) AZ30	Parrot droppings	A/VNI	A	D	D	A	E	H	A	A	A	B	F	E	D
(17) C1	Clinical isolate, HIV+	A/VNI	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
(18) C3	Clinical isolate, HIV+	A/VNI	B	D	D	E	B	B	B	B	B	B	B	B	B
(19) C4	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	B	D	D	D	B	H	G	B	A	D	D	D	D
(20) C5	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	A	D	D	B	F	G	B	A	E	B	D	E	D
(21) C6	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	A	D	D	D	A	G	B	A	C	A	D	D	D
(22) C7	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	C	D	D	D	B	H	G	A	A	B	D	E	A
(23) C8	Clinical isolate, HIV+	A/VNI	D	A	D	B	B	A	B	D	A	B	D	E	A
(24) C9	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	D	C	E	D	E	F	A	B	E	B	D	E	D
(25) C10	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	C	D	D	B	A	G	F	B	E	A	D	E	D
(26) C11	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	B	B	D	B	D	B	F	D	A	E	A	B	E
(27) C12	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	B	D	B	B	F	G	A	B	D	B	B	E	D
(28) C13	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	A	B	B	B	B	F	G	B	E	B	B	F	B
(29) C14	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	A	D	B	B	H	G	D	B	E	B	B	F	B

Table 1 (Continued)

Species/Variant Strain number	Characteristics	Serotype/Molecular Type	KYQ131	KYQ145	KYQ172	KYH84	KYH85	KYQ72	KYQ88	KYV22	KYH24	KYV91	KYQ99	KYV73	KYH02	KYV60	KYQ139	KYV102	KYQ177	KYQ83	KYQ100	KYV83
(30) C15	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	B	D	D	D	B	F	H	B	A	D	C	D	E	B	F	B	D	G	D	D
(31) C16	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	A	B	D	D	A	H	G	D	A	D	B	D	E	B	E	B	D	F	D	D
(32) C17	Clinical isolate, CSF, HIV+	A/VNI	D	B	D	D	A	H	G	D	A	E	B	D	F	D	E	B	D	F	D	D
(33) C18	Clinical isolate, HIV+	A/VNI	B	D	D	A	A	B	B	A	A	D	B	D	F	D	E	B	D	F	D	D
(34) C19	Clinical isolate, HIV+	A/VNI	B	D	D	A	A	B	B	A	A	D	B	D	F	D	E	B	D	F	D	D
(35) C27	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	D	D	D	E	B	E	G	B	E	F	D	D	E	D	F	E	D	F	D	D
(36) C29	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	B	B	D	B	A	D	A	A	A	D	A	A	B	A	D	B	D	D	D	D
(37) C31	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	A	A	D	E	F	A	E	H	D	A	A	A	E	A	G	A	A	G	F	D
(38) C32	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	B	A	D	H	B	D	D	B	B	D	A	B	D	D	F	E	D	F	D	D
(39) C33	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	B	D	F	D	B	B	A	A	B	D	B	B	B	F	D	B	B	F	D
(40) C34	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	D	D	F	H	D	B	B	B	B	E	B	D	D	D	E	D	E	G	D	D
(41) C49	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	D	E	D	B	F	H	D	B	B	B	B	D	D	H	B	D	G	E	E
(42) C30	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	A	A	E	B	A	D	D	B	A	E	A	A	A	A	F	A	A	D	C	B
(43) C51	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	A	D	D	B	A	H	G	A	D	A	A	D	G	D	E	D	H	D	B	B
(44) C52	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	F	E	B	B	F	F	B	B	B	D	D	F	D	H	G	D	E	F	D
(45) C53	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	D	D	G	F	C	H	D	A	D	D	B	D	G	D	F	D	D	D	F	D
(46) C54	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	A	D	E	D	A	G	H	A	A	D	A	D	F	E	H	F	E	F	F	D
(47) C35	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	B	D	D	E	D	B	F	G	B	A	D	A	G	D	G	F	D	H	D	D
(48) C56	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	D	F	D	B	F	G	B	A	D	D	A	F	D	H	F	D	H	D	D
(49) C57	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	A	B	B	C	B	B	G	A	A	E	B	A	F	D	E	F	D	G	F	D
(50) C58	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	A	A	E	D	B	B	G	H	C	A	D	D	F	E	F	D	D	F	F	D
(51) C29	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	A	A	B	B	A	H	G	D	D	B	A	D	F	E	H	E	B	G	D	E
(52) C60	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	C	F	F	B	B	G	H	D	B	A	D	F	D	H	F	B	F	D	E
(53) C61	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	C	D	G	E	B	G	H	D	B	A	C	D	E	D	F	F	D	H	E	E
(54) C62	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	D	G	D	A	F	H	A	A	D	B	D	D	D	H	F	D	H	E	E
(55) C63	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	D	H	D	B	F	G	D	B	B	B	B	F	F	F	F	B	B	H	E
(56) C64	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	B	B	E	D	B	B	B	B	B	B	D	B	G	E	H	D	D	D	E	D
(57) C65	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	B	B	D	B	B	D	D	A	A	B	B	B	A	C	F	B	B	B	E	B
(58) C67	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	B	F	B	A	B	B	A	B	A	B	B	A	E	B	B	D	D	B	B
(59) C68	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	D	D	D	A	A	G	H	B	A	A	B	A	F	D	H	E	A	F	E	D
(60) C69	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	A	D	C	B	A	A	G	A	D	A	A	B	G	G	H	D	D	H	D	B
(61) C70	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	B	E	D	B	B	B	B	D	B	B	B	F	D	G	E	D	F	D	D
(62) C71	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	D	B	F	E	D	H	F	D	B	B	B	A	E	F	G	E	D	F	D	D
(63) C72	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	D	E	G	F	B	H	G	B	D	D	D	A	D	F	H	B	D	G	E	D
(64) C73	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	A	D	D	D	D	G	F	B	A	B	A	B	E	D	G	D	D	F	E	D
(65) C74	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	D	D	E	D	B	F	B	B	B	B	A	B	F	E	H	D	B	F	D	D
(66) C75	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	C	D	H	D	D	G	H	A	A	B	D	D	G	F	F	B	B	H	D	B
(67) C76	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	A	A	D	D	D	A	G	H	A	A	B	D	F	E	G	B	B	H	D	B
(68) C81	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	D	E	D	B	E	F	B	A	D	B	B	D	D	F	B	D	D	D	D
(69) C84	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	B	B	F	F	B	H	F	B	B	B	D	D	E	G	F	B	D	D	F	E
(70) C82	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	B	D	E	D	B	G	H	B	A	D	B	B	F	F	F	C	C	G	E	E
(71) C83	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	A	D	D	D	A	G	H	D	A	D	B	B	E	D	E	B	D	H	D	D
(72) C86	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	D	E	D	B	F	G	B	A	D	E	B	E	B	F	D	C	G	G	E
(73) C101	Clinical isolate, Male, HIV+	A/VNI	B	D	E	D	B	F	G	A	A	D	D	B	E	B	E	B	A	H	D	D
(74) C102	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	A	D	D	D	A	A	G	H	A	A	D	B	C	E	D	E	H	E	E	F
(75) C103	Clinical isolate, Female, HIV+	A/VNI	D	D	G	F	B	H	D	A	A	D	B	A	D	D	F	B	D	E	E	F

Table 1 (Continued)

Species/Varieties Strain number	Characteristics	Seootype/Molecular Type	KYL038	KYQU100	KYQU83	KYQU127	KYL012	KYQU139	KYL060	KYE02	KYL073	KYQU99	KYL091	KYH049	KYL022	KYQU88	KYQU72	KYH055	KYH088	KYQU112	KYQU45	KYQU31
<i>C. n. var. neoformans</i>																						
(1) ATCC28957	Human body lesion	DVNTV		C	G	C	C	D	G	G	B	B	D	B	B	H	H	B	D	D	D	B
(2) ATCC28958	Pigeon droppings	DVNTV	C	C	G	D	C	E	F	F	B	B	C	C	A	G	G	A	C	D	B	B
(3) E10	Pigeon droppings	DVNTV	C	C	G	D	B	D	F	F	B	B	A	A	A	G	E	A	C	D	D	A
(4) E11	Bacalypus spp.	DVNTV	C	D	G	D	C	D	E	F	B	B	C	C	A	F	G	A	C	D	D	A
(5) E12	Bacalypus spp.	DVNTV	C	D	G	D	C	D	F	F	B	B	A	A	A	F	G	A	C	D	D	B
(6) E13	Bacalypus spp.	DVNTV	C	D	G	D	C	D	E	F	B	B	A	A	A	F	G	A	C	D	D	A
(7) E14	Bacalypus spp.	DVNTV	C	D	G	D	C	D	E	F	B	B	A	A	A	F	G	A	C	D	D	B
(8) E15	Bacalypus spp.	DVNTV	C	D	G	D	C	D	E	F	B	B	A	A	A	F	G	A	C	D	D	B
(9) E16	Bacalypus spp.	DVNTV	C	D	G	D	C	D	E	F	B	B	A	A	A	F	G	A	C	D	D	A
(10) E17	Bacalypus spp.	DVNTV	C	D	G	D	C	D	E	F	B	B	A	A	A	F	G	A	C	D	D	B
(11) E18	Bacalypus spp.	DVNTV	C	D	G	D	C	D	E	F	B	B	A	A	A	F	G	A	C	D	D	A
(12) E19	Bacalypus spp.	DVNTV	C	D	G	D	C	D	E	F	B	B	A	A	A	F	G	A	C	D	D	A

*Killer yeasts: *Kodonomys ohmeri* (KYH055, KYH088), *Candida catenulata* (KYQU31, KYQU127, KYV102), *Trichosporon faecale* (KYQU45, KYQU100, KYQU88, KYQU72, KYQU112), *Kluyveromyces marxianus* (KYL022), *Trichosporon apicola* (KYH049, KYE02, KYQU139), *Trichosporon oxidans* (KYL091), *Kluyveromyces fragilis* (KYQU99, KYQU73), *Trichosporon coniforme* (KYL060, KYLC60, KYLC33, KYQU83).

A, no halo; B, 1–4mm; C, 4–10mm; D, 11–15mm; E, 16–20mm; F, 21–25mm; G, 26–30mm; H, >31mm.

Highlighted columns indicate that the killer yeasts with correlation between the killer sensitivity and the variety of species of *Cryptosporidium* tested. A, B and C scores are highlighted in bold; D, E, F, G and H are highlighted in grey.

inhibition halo was observed by means of optical and scanning electron microscopy 15, 21 and 27 hours after inoculation.

Optical and Scanning electron microscopy (SEM) of cells within the inhibition halo

Optical microscopic observations were performed at a 1000× magnification. For the scanning electron microscopy, small blocks of the YM-MB medium containing dead cells from within the inhibition halos were collected for fixation [18]. The samples were fixed overnight at 4°C with 2% (v/v) glutaraldehyde, 2% (v/v) paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2. The specimens were rinsed in the same buffer, dehydrated in a series of 30–100% acetone solutions, dried to the critical point in CO₂ (CPD 030 BALTEC), and coated with gold in a sputter-coater (SCD 050 BALTEC). This material was examined in a Jeol JSM 5800 scanning electron microscope (SEM) at the Electron Microscopy Center of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME/UFRGS, Porto Alegre/RS). Control samples (small blocks of YM-MB medium containing a rug of intact cells from the sensitive *Cryptococcus* isolates) provided sufficient information on the structural features of undamaged cells.

Results

The identification of killer yeasts and data concerning the growth inhibition halos of the clinical and environmental isolates of *C. neoformans* and *C. gattii* are shown in Table 1. All strains were inhibited by at least eight killer yeasts, 65% were inhibited by more than 17 yeasts, 82% by more than 15 yeasts, and 14% by all killer yeasts. *T. japonicum* KYQU139 inhibited all the *Cryptococcus* isolates, while *T. faecale* KYQU45, KYQU88 and *T. coremiiforme* KYLC83 inhibited all but one. Sensitivity patterns to the killer toxins demonstrated that there is a correlation between sensitivity to strains KYQU45, KYQU112, KYQU100 and KYLC83 sensitivity and the variety or species of *Cryptococcus*. *C. neoformans* var. *grubii*, was found to be the most sensitive, with halos ≥ 1 mm (letters D, E, F, G or H). In contrast, *C. gattii* was much less sensitive, with some isolates total resistant (letter A). Isolates of *C. neoformans* var. *neoformans* were found to be both resistant and intermediately sensitive. Taking into account the number of isolates for each *Cryptococcus* species or variety and the four killer yeasts capable of discriminating them (KYQU45, KYQU112, KYQU100 and KYLC83), we calculated

the percentage of strains in groups A, B and C. The results were as follows; *C. gattii* (40%), *C. neoformans* var. *neoformans* (62.5%) and *C. neoformans* var. *grubii* (19%). Clearly, *C. neoformans* var. *grubii* are more sensitive than the others. If we take into account only the number of isolates with A scores, the results are the following; *C. gattii* (9.6%), *C. neoformans* var. *grubii* (2%) and *C. neoformans* var. *neoformans* with no A, showing its intermediate sensitivity (Table 1). There was no correlation between killer sensitivity and the variety, molecular type and species for all the other killer strains tested in this study. A hierarchical cluster based on the quantitative data matrix (QDM) is shown in Fig. 1, which indicates that there was complete discrimination of susceptibility among the *Cryptococcus* isolates tested by means of killer sensitivity typing.

Scanning electron microscopy of the varieties of *C. neoformans* after 24 h of action of the killer toxin revealed globular cells between 4 and 5 µm in diameter and a large amount of scattered small protusions (bud scars), without formation of pores or cell wall disruption (Fig. 2). In *C. neoformans* var. *grubii* strains, a peculiar rippled surface and sharp structures, probably buds among the G and S-phases, were observed all over the surface of the cells. The cells of *C. neoformans* var. *neoformans* just presented an undulating surface, without the presence of the sharp structures. Observations made with optical microscopy revealed that the cells of both varieties of *C. neoformans* presented an alteration in the growth pattern, when compared to controls cells. Specifically, we noted cells without buds (G1-phase cells), a significant number of cells with small buds (the diameter of the bud having less than 1/3 of parent cell diameter = S-phase cells) and a smaller number of cells with medium and large buds (the diameter of the buds being more than 1/2 and 2/3 of the parent cell diameter = M-phase cells). A larger number of cells in the S-phase and M-phase were observed within the inhibition halo of *C. gattii*, but this did not allow a clear differentiation of the species. Optical and SEM microscopic observations were similar after 21 and 27 hours of action of the killer toxins. Cells within the inhibition halo were streaked on YM-MB agar plates and incubated at 25°C for 24, 48, 72 and 96 h. No growth was found, suggesting that the toxins may have a fungicidal mode of action. To confirm these results, cells were also inoculated into YM broth and incubated under the same conditions. No growth was again noted for these strains. Through India ink staining we noted the presence of the polysaccharide capsule in *C. gattii* after the dehydration procedure for SEM in dead cells and cells which have not been in contact with the killer strains (result not shown).

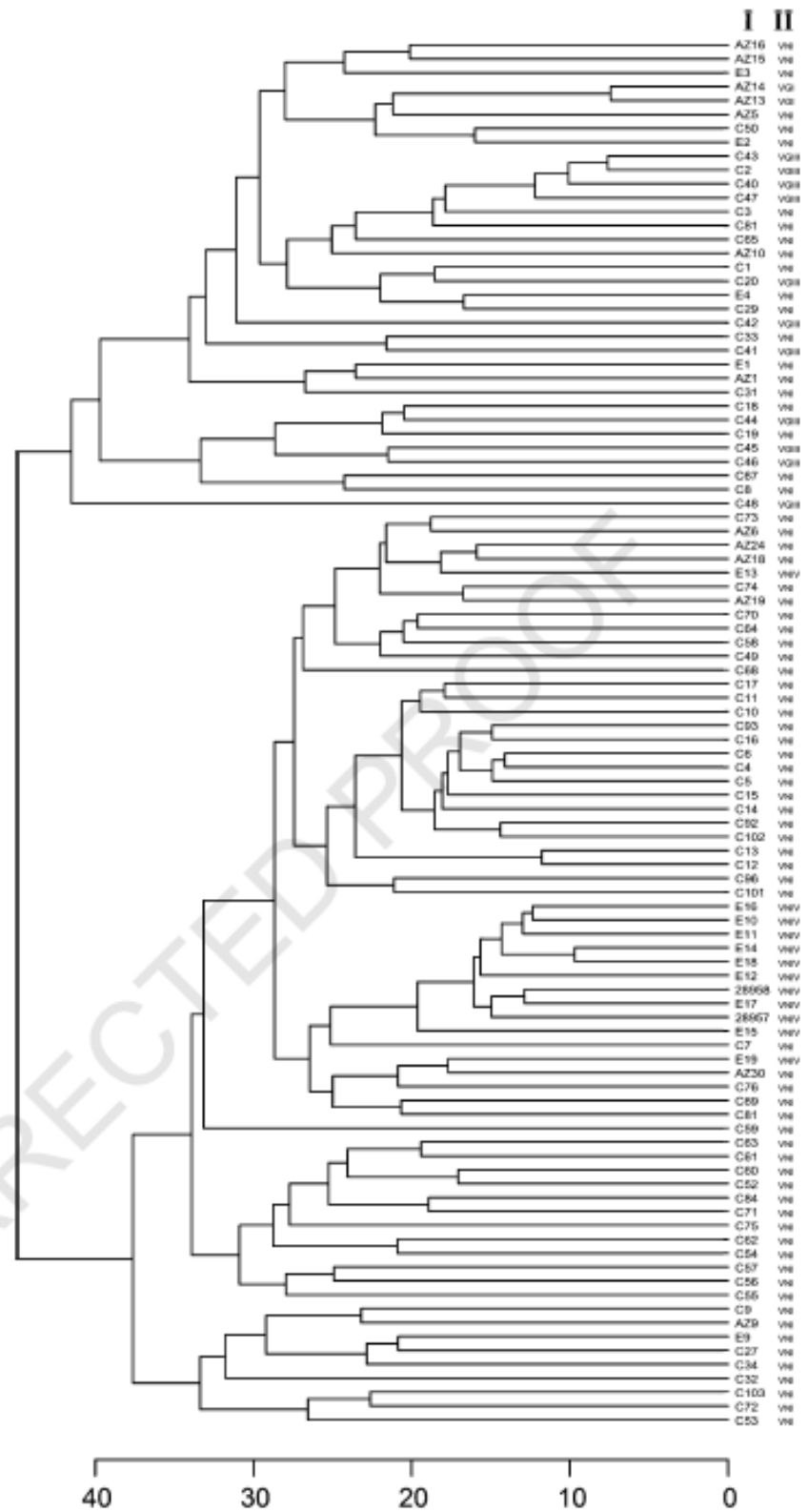


Fig. 1 (Continued)

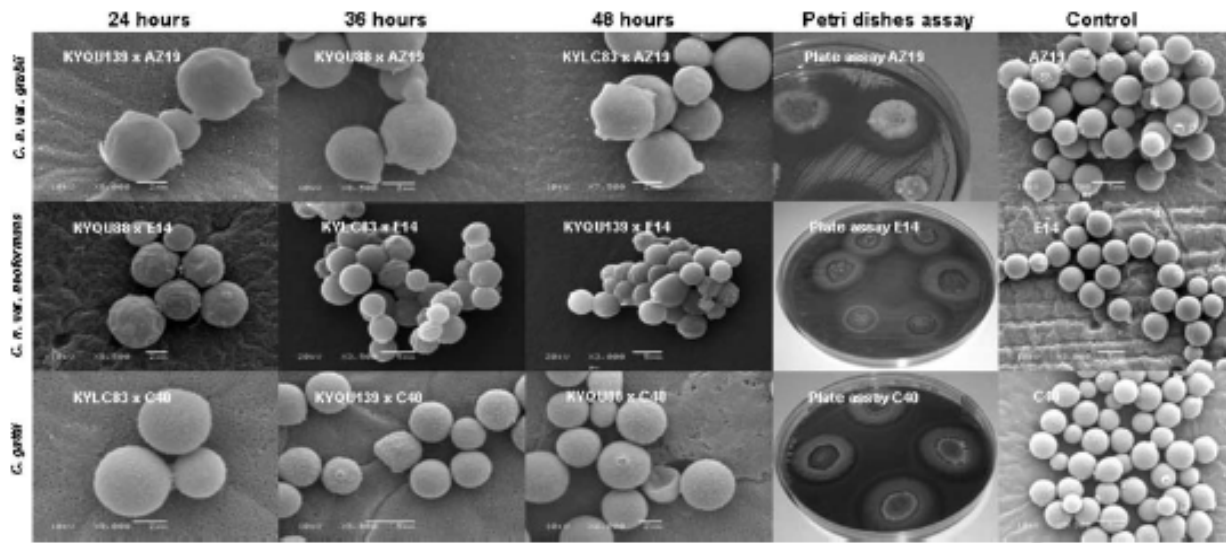


Fig. 2 Scanning electron microscopy (SEM) of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (AZ19), *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (E14) and *Cryptococcus gattii* (C40) exposed to the following killer yeasts: *T. japonicum* KYQU139, *T. faecale* KYQU88 and *T. coremiforme* KYLC83. The corresponding killer plate assay and the SEM of the control alive *Cryptococcus* cells are demonstrated at the rightmost of the figure. Bar scales are presented in each image.

Discussion

The high level of inhibition of *Cryptococcus* isolates by killer yeasts is very interesting, especially in light of the fact that isolates had similar sensitivity patterns, irrespective of their clinical/environmental origins, species or variety. Five killer strains were capable of inhibiting at least 99% of the *Cryptococcus* isolates, and seem to be of promise as the source of new antifungal agents aimed at controlling this microorganism. This is crucial because prolonged use of antifungals in treating cryptococcal meningitis possesses several disadvantages due to the toxic effects of the agents and the development of resistance [19,20].

There was no correlation among the isolates obtained from different patients, hospitals, molecular types, or areas in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (Fig. 1). Strains obtained from different hospitals had similar molecular types, making their tracking difficult. The method proposed in the present study could complement the data obtained by molecular fingerprinting, discriminating the molecular types into phenotypic groups based on their sensitivity patterns to killer toxins. This would be important in cases of nosocomial infections or in epidemiological studies. The diversity of cell-wall receptors involved in the binding of killer toxins could be the basis for the different

sensitivity patterns demonstrated by strains belonging to the same molecular type, but more experiments are necessary to clarify this point.

The presence or absence of killer sensitivity allowed Boekhout and Scorzetti [9] to distinguish ten different killer types within *C. neoformans* and *C. gattii* using six killer basidiomycetous yeasts. Their smaller discriminatory power, when compared to our data, is probably due to the following three factors; low number of killer yeasts, no hierarchical cluster analysis of the binary data and the use of qualitative rather than quantitative data (halo diameter). Lemmer *et al.* [11] using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy as an additional typing method to PCR fingerprinting obtained results similar to ours with 110 isolates of *C. neoformans*. However, the QDM fingerprint method based on killer sensitivity patterns is a cheaper methodology (it does not require sophisticated equipments nor licensed softwares) and is easy to perform, appropriate for laboratories with minimal resources. It could also be applied in control laboratories for registration, patenting, recognition and quality checking of culture collections.

In this work we report an innovative technique for the analysis of susceptibility of the sensitive strains to the injurious cellular effect of the toxins secreted by the

Fig. 1 Dendrogram of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* strains obtained by the killer sensitivity patterns analyzed through a quantitative data matrix (QDM). I. Strain numbers. II. Molecular type following the molecular standards provided by the Molecular Mycology Laboratory in Sydney, Australia [12].

killer yeasts. This technique is based on the fact that the cells of the sensitive strain are able to begin multiplication before the toxin is produced and can act. Thus, the inhibition halo is not devoid of cells, but cells present are damaged by the action of the toxin. This indicates that death depends on the accumulation of the toxin secreted from killer strain into the media, and this process takes some time. Several mechanisms of action have already been reported, i.e., disruption of the cytoplasmic membrane with formation of ion channels and release of ATP, blockage of the DNA synthesis, and cell cycle arrest at the G1/S phases [21]. Optical and SEM microscopy of cells within the inhibition halo could provide the basis for clarifying the mechanism of action of these toxins. The high number of cells with small buds or without buds in *C. neoformans* isolates exposed to the toxins, allied to the absence of visible pores or extrusion of the cytosol, suggest that these toxins act by interrupting cell cycle development. The larger number of cells in the S and M-phase within the inhibition halo of *C. gattii* suggest that cell cycle arrest may happen in a different phase in this species, but this has to be tested. The mucoid substance in *C. gattii* strains, possibly the more abundant polysaccharide capsule in comparison to *C. neoformans*, might have been responsible for the non perception of morphologic alterations in their cellular wall by SEM.

Vadasz *et al.* [22], evaluating the effect of the K2 toxin on cells of *S. cerevisiae* by SEM observed the extrusion of the cellular cytosol. However, the authors used mixed populations of sensitive and killer yeasts and observed the results in the stationary growth phase, when other factors may be influencing cell death. Knowing that the process of toxin secretion and accumulation in the media might be highly variable between different laboratories, the use of purified toxins should reduce those differences. But the diversity of cell-wall receptors involving in the binding of killer toxins is probably the basis for the different sensitivity patterns demonstrated by *Cryptococcus* strains.

In conclusion, the *Cryptococcus* strains analysed had a pattern of high susceptibility to killer toxins. We were able to select some killer yeasts that produce toxins which show promise for the development of new antifungal agents aimed at the treatment of cryptococcosis. There was a complete discrimination of the strains using a typing method based on killer sensitivity patterns. This method cannot replace genotyping, but killer sensitivity typing and PCR-fingerprinting can be used together to enhance the discrimination of isolates in epidemiological studies. Optical and SEM

microscopy showed that there was no formation of pores on the cell surface of the sensitive cells in contact with the toxins. This might suggest that the killing mechanism does not act through the release of cellular components through pores produced on the cell surface. However, to clearly establish the action of the toxin more studies are necessary.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). The automated DNA sequencing was performed at the facilities of the Brazilian Genome Network at Center of Biotechnology, CBIOT-UFRGS-RS.

References

- 1 Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 2006; 60: 69–105.
- 2 Levitz SM. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 1163–1169.
- 3 Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, *et al.* Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurians* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenozymetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 2002; 51: 804–806.
- 4 Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 838–840.
- 5 Meyer W, Castañeda A, Jackson S, *et al.* Molecular typing of iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 189–195.
- 6 Boekhout T, Theelen B, Diaz M, *et al.* Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol* 2001; 147: 891–907.
- 7 Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, *et al.* Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *Syst Appl Microbiol* 2000; 23: 535–545.
- 8 Diaz MR, Boekhout T, Kiesling T, *et al.* Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* 2005; 5: 1129–1140.
- 9 Boekhout T, Scorzetti G. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 147–149.
- 10 Farina C, Arosio M, Moiola F, *et al.* Phenotyping of *Cryptococcus neoformans* strains in Bergamo, Italy. *New Microbiol*; 26 1985; 2003: 83–90.
- 11 Lemmer K, Naumann D, Raddatz B, *et al.* Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* by PCR fingerprinting in comparison to serotyping and Fourier Transform Infrared Spectroscopy used for phenotyping. *Med Mycol* 2004; 42: 135–147.
- 12 Casali A, Goulart L, Rosa e Silva LK, *et al.* Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res* 2003; 3: 405–415.

- 415 13 Abegg M, Cella F, Faganello J, et al. *Cryptococcus neoformans*
and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaci-
formes in a southern brazilian zoological garden. *Mycopathologia*
2006; 161: 83–91.
- 420 14 O'Donnell K. Fusarium and its near relatives. In: Reynolds DR,
Taylor JW (eds). *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and*
Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. CAB International,
Wallingford, UK, 1993: 225–233.
- 425 15 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST
and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389–3402.
- 430 16 Fuentefria A.M., Franskoviaki L, Mercado L., et al. Inhibition of
clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates by
two Brazilian killer yeasts. *J Basic Microbiol* 2006; 2: 87–93.
- 17 Buzzini P, Berardinelli S, Turchetti B, et al. Fingerprint of yeasts
at the strains level by differential sensitivity responses to a panel of
selected killer toxins. *System Appl Microbiol* 2003; 26: 466–470.
- 18 Faganello J, Arruda W, Schrank A, et al. An alternative method
to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*
for scanning electron microscopy analysis. *J Microbiol Meth*
2006; 64: 416–419.
- 435 19 Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, et al. Evaluation of E-test
method for determining voriconazole and amphotericin B MICs
for 162 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin*
Microbiol 2003; 41: 97–99.
- 440 20 Viviani MA. Cryptococcal meningitis: diagnosis and treatment.
Int J Antimicrob Agents 1996; 6: 169–173.
- 21 Magliani W, Conti S, Gerloni M, et al. Yeast killer systems. *Clin*
Microbiol Rev 1997; 10: 369–400.
- 445 22 Vadasz AS, Jagganath DB, Pretorius IS, et al. Electron micro-
scopy of the K2 killer effect of *Saccharomyces cerevisiae* T206 on
a mesophilic wine yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 78: 117–
122.

UNCORRECTED PROOF

2.9 Biotipagem do *Staphylococcus epidermidis*

**ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO - *JOURNAL OF BASIC
MICROBIOLOGY* (2007)**

**Typing of *Staphylococcus epidermidis* clinical strains by a selected
panel of Brazilian killer yeasts.**

Alexandre M. Fuentefria, Leandro Reus Rodrigues Perez, Pedro Alves d'Ázevedo,
Augusto Schrank, Marilene H. Vainstein, Patrícia Valente

1 **Typing of *Staphylococcus epidermidis* clinical**
2 **strains by a selected panel of Brazilian killer yeasts**

3

4 Alexandre M. Fuentefria¹; Leandro R. R. Perez², Pedro Alves
5 d'Azevedo², Fabiano Pazzini¹, Augusto Schrank¹, Marilene H. Vainstein^{1,3},
6 Patricia Valente³

7 ¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade
8 Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

9 ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fundação Faculdade
10 Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Brazil.

11 ³Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do
12 Sul, RS, Brazil.

13

14 **Keywords:** killer yeast; typing, discrimination, *Staphylococcus*
15 *epidermidis*.

16 **Correspondence to:** Dr. Patricia Valente, Departamento de
17 Microbiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua
18 Sarmiento Leite, 500 sala 158, 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil
19 Phone +55 (051) 33083935 FAX +55 (051) 33083445
20 e-mail: patricia.valente@ufrgs.br

1 **Abstract**

2 Discrimination of multi-resistant microorganisms in small clinical
3 microbiology laboratories is frequently based on the biologic profile
4 (biotype) of phenotypic markers, such as antimicrobial susceptibility
5 patterns (antibiograms) and serologic or enzymatic typing, but few use
6 indicative microorganisms. The purpose of this study was to evaluate the
7 power of a panel of selected killer yeasts for differentiating and
8 discriminating clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from two
9 care hospitals and clinical microbiology laboratories from the South of
10 Brazil. The short panel of eleven killer yeasts was capable of
11 discriminating 100% of the sensitive strains of *S. epidermidis* using
12 quantitative data matrix (QDM) and differentiating them from strains of
13 coagulase-positive *Staphylococcus*. Therefore, this phenotypic
14 methodology proved to be valid as a discriminatory tool when applied to
15 these clinical bacteria strains, besides being simple and feasible for
16 routine use even in microbiological laboratories with minimal resources.
17

1 **Introduction**

2 The first use of the yeast killer system for inter- and intraspecific
3 discrimination of microorganisms was reported for *Candida albicans*
4 isolates, proving to be an epidemiological tool of great value in identifying
5 presumptive cases of nosocomial fungal infections [1]. Later, the killer
6 system was applied to the differentiation of other opportunistic yeasts and
7 molds, such as *Candida glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*,
8 *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudallescheria*
9 *boydii*, *Penicillium camemberti*, and *Aspergillus niger* [2, 3, 4, 5, 6, 7].
10 Following initial descriptions that the killer phenomenon could act against
11 eukaryotic microorganisms other than fungi and some prokaryotic
12 microorganisms, the method was applied to the differentiation of
13 etiological agents of nocardiosis and gram-positive pathogenic bacteria, as
14 well as slow-growing bacteria, such as mycobacteria [8, 9, 10].

15 Many phenotypic methods, such as resistotyping, auxotyping,
16 enzymotyping, bacteriocin susceptibility, phage typing and ribotyping have
17 been used for biotyping multi-resistant bacteria, but small clinical
18 laboratories usually apply antimicrobial susceptibility patterns (quantitative
19 antibiograms) and serologic typing (serotype) [11, 12, 13, 14]. The killer
20 system may represent a simple, inexpensive, sensible and reproducible
21 tool for discrimination of multi-resistant bacterial strains in microbiological
22 laboratories with minimal resources.

1 In the present study, the susceptibility to the killer toxin of different
2 strains of *Staphylococcus epidermidis* , an important cause of hospital-
3 acquired infections, was investigated at two care hospitals and clinical
4 microbiological laboratories (AMB) located in the South of Brazil.
5 Mathematical models were applied to differentiate the strains of multi-
6 resistant *Staphylococcus* and to discriminate sensitive strains of *S.*
7 *epidermidis* by means of the effects of a selected panel of killer yeasts.
8 Different data matrices were applied in accordance to specific indices for
9 the measurement of the discriminatory power.

10

11 **Materials and methods**

12 **Strains.** A killer panel composed of 11 strains (Table 1) was selected from
13 a previous screening of about six hundred yeasts and yeast-like strains
14 obtained from raw milk (KYL_V), raw goat milk (KYL_C), cheese (KYQ_U),
15 phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* (KYH_B), phylloplane of bromeliads
16 (KYB_I) and fruits (KYF) in Brazil. For molecular identification of the killer
17 yeasts, the D1/D2 domains of the 26S rDNA gene were sequenced using
18 the primers NL₁-5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' and NL₄-
19 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3' [15]. DNA sequencing reactions were
20 performed using the DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing
21 (MegaBACE) kit and run on MegaBACE 1000 capillary sequencers
22 (Amersham Biosciences). Sequences were assembled using

1 phred/phrap/consed (<http://www.phrap.org>) and analyzed with [Nucleotide-](#)
2 [nucleotide BLAST \(blastn\)](#) program [16], available in the site
3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. The killer yeast *Kodamaea ohmeri*
4 KYHB55 was previously identified by sequencing of D1/D2 domains of the
5 26S rDNA gene [17]. Cultures were maintained at 4°C in GYMP (Glucose
6 2%, Yeast Extract 0.5%, Malt Extract 2%, Monobasic Sodium Phosphate
7 0.2%, Ágar 2%) slants covered with sterile mineral oil, and deposited at
8 the yeast culture collection of the Microbiology Department of the Federal
9 University of Rio Grande do Sul.

10 The sensitive panel was composed by seventy multi-resistant gram-
11 positive isolates obtained from two hospitals (H1 and H2) and clinical
12 microbiological laboratories (AMB) in Porto Alegre city, South of Brazil. Of
13 these, 35 were multi-resistant *S. epidermidis* (SCN, SCNunc), and the
14 remaining multi-resistant *S. aureus* (SAU, SAUunc) isolates (Table 1,
15 Fig.2). Cultures were maintained at –20°C in double-strength skim milk
16 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Isolates were identified as *S.*
17 *aureus* if they were Gram positive cocci, catalase and coagulase positive,
18 and identified as *S. epidermidis* if they were Gram positive cocci, catalase
19 and phosphatase positive, coagulase and oxidase negative, susceptible to
20 furazolidone and novobiocin, and producing acid from maltose and
21 sucrose but not from trehalose.

22

1 **Killer assay.** Assessment of killer activity was performed in Mueller-Hinton
2 Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Overnight grown target cells
3 from gram-positive isolates were suspended in distilled water to a density
4 of equivalent to the 0.5 MacFarland standard, and spread on the assay
5 Petri dishes. Inoculum of potential killer yeasts was prepared as
6 suspensions (10^6 cells/mL) of 24h cells, imprinted onto the solidified
7 Asurface by the Steer's replicator, and incubated at 37°C for 48h. The
8 killer activity was considered positive if there was an evident zone of
9 inhibition of the gram-positive isolate around the inoculum of the killer
10 yeast, and as negative if a clear inhibition zone was absent. There were
11 no discrepant results in three repeated experiments.

12

13 **Statistical assessment of growth inhibition zone.** Using a metric ruler,
14 the inhibition zone was measured in millimeters for each sensitive strain.
15 The data represent the average value of three separate determinations (p
16 < 0.01). Statistic assessment of data was obtained by ANOVA. The
17 occurrence (1) or absence (0) of the killer character in each one of the
18 tested strains was plotted in a first matrix of data, denominated binary data
19 matrix (BDM). The BDM was then converted in a triplet data matrix (TDM)
20 by combination of binary data in triplets. Finally, the quantitative data
21 matrix (QDM) was obtained by replacing halo values for capital letters,
22 according to the size of the inhibition haloes reported in Table 1 (i.e. A: 0 -

1 4mm; B: 5 - 8mm; C: 9 -12mm; D: >12mm) [7]. The discriminatory power
2 of each data matrix was calculated by using specific indices for the
3 measurement of diversity: Simpson's index (λ) and Hunter and Gaston's
4 index (D) [18].

5 For demonstrating the efficacy of Quantitative data matrix (QDM), a
6 cluster analysis was performed using normalized Euclidean distance
7 matrix, through the statistical free software's R Package, version 4.0 and
8 Phylip, version 3.57. Neighbor joining clustering method was used to
9 obtain the final dendrogram, with a 10,000 times resampling with
10 replacement using a bootstrap procedure. A consensus tree was obtained
11 using the CONSENSUS application from PHYLIP software.

12

13 ***Antibiogram Determination***

14 Antibiograms were determined by disk diffusion on Muller-Hinton agar
15 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Suspensions of fresh cultures of
16 bacteria in saline were adjusted to 0.5 McFarland and further applied to
17 agar plates, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute
18 (CLSI). Inhibition by a panel of antibiotics comprising penicillin,
19 tetracycline, riphampicin, sulfamethoxazole, and chloramphenicol was
20 evaluated. Antibiotic disks were obtained from Oxoid. The inhibition zones
21 were used for cluster analysis.

22

23 **Results and Discussion**

1 The identification of killer yeasts can be seen in Table 1. While *S.*
2 *aureus* isolates were not inhibited (data not shown), all *S. epidermidis*
3 clinical strains were sensitive to at least one of the killer yeasts included in
4 the panel (Table 1). As *S. aureus* and *S. epidermidis* are not sister taxa in
5 phylogenetic trees based on 16S rDNA, HSP60 (gene and protein), *rpo B*
6 and *sod A* sequences [19, 20, 21, 22], and as *S. epidermidis* strains seem
7 to be less diverse than other coagulase-negative staphylococci [23, 24,
8 25], we believe that the isolation of a *S. epidermidis* strain resistant to all
9 killer yeasts is highly improbable. The short and selective panel of eleven
10 killer yeasts allowed the discrimination of 90%, 97% and 100% of the
11 sensitive strains using binary data matrix (BDM), triplet data matrix (TDM)
12 and quantitative data matrix (QDM) analysis methods, respectively. The
13 correlation between the number of killer yeasts (KY) and the number of
14 discriminated strains (DS) of *S. epidermidis*, demonstrated that the
15 quantitative data matrix (QDM) has a higher discriminatory power
16 compared to the other methods of data matrices (Fig.1a). The
17 discriminatory power (D) was calculated in accordance to two indices for
18 the measurement of diversity. Figure 1b and 1c report the variation of the
19 indices of Simpson (λ) and Hunter and Gaston (D) in relation to number of
20 killer yeasts (KY) for the three analysis methods. QDM showed higher
21 values of λ and D than that exhibited by BDM or TDM with a larger number
22 of killer yeasts, although the effectiveness of TDM is only a little smaller
23 (Fig. 1b, c). This result points at QDM as the probable best tool for

1 analyzing the typing data of these multi-resistant bacteria obtained by
2 sensitivity to the killer system, as had already been verified for yeasts [7].
3 The results presented in this study show that through an appropriate
4 selection of killer yeasts it is possible to obtain a panel with a low number
5 of killer descriptors that supplies a high discriminatory power.

6 The dendrogram obtained by quantitative data matrix after random
7 variation of the results (bootstrap) is shown in Figure 2. The *S. epidermidis*
8 and *S. aureus* strains were aggregated into two large groups, the first
9 group including most of the strains of *S. epidermidis* and a second one
10 comprising all the strains of *S. aureus* plus *S. epidermidis* SCN9, SCN136,
11 SCN167, SCN179, SCNunc9 and SCNunc13. Cluster analysis expressed
12 clearly that there was no correlation between the origins of the clinical
13 isolates (AMB, H1 and H2) or their antibiotic resistance profiles and the
14 killer sensitivity. Based on the discriminatory effect obtained with the killer
15 yeast typing methodology, it is suggested that the *S. epidermidis* strains
16 analyzed do not possess epidemiological links among each other,
17 although this hypothesis still needs to be tested.

1 Nevertheless, we should also stand out that the killer sensitive *S.*
2 *epidermidis* strains are resistant for several antibiotics, suggesting the
3 possibility of a new approach to the treatment of infections caused by
4 these multi-resistant bacteria through the use of the purified killer toxins or
5 synthetic antiidiotypic antibodies [26]. This is emphasized by the fact that,
6 with few exceptions, the killer yeasts studied to date lose their activity at or
7 near human body temperature (37°C) [27], but the yeasts that compose
8 the present panel were chosen for their capacity of growing, and
9 expressing the toxin at this temperature.

10 The application of killer yeasts with potential as epidemiological
11 biomarkers is an important alternative (or a complementary technique) to
12 the molecular methods of typing. In this paper we selected a panel of
13 eleven killer yeasts, identified by molecular methods, capable of being
14 used as phenotypic markers for discrimination of *S. epidermidis* clinical
15 strains. This characteristic, associated to the methodological easiness and
16 low cost of the method, may allow a routine use in microbiological
17 laboratories with minimal resources.

18

1 **References**

- 2 [1] Polonelli L., Archibusacci C., Sestito M., Morace G., 1983. Killer
3 system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J.*
4 *Clin. Microbiol.* **17**, 774–780.
- 5 [2] Fanti F., Conti S., Campani L., Morace G., et al., 1989. Studies on the
6 epidemiology of *Aspergillus fumigatus* infections in a university hospital.
7 *Eur. J. Epidemiol.* **5**, 8-14.
- 8 [3] Polonelli L., Dettori G., Cattel C., Morace G., 1987. Biotyping of
9 mycelial fungus cultures by the killer system. *Eur. J. Epidemiol.* **3**, 237–
10 242.
- 11 [4] Buzzini P., Martini A., 2000. Differential growth inhibition as a tool to
12 increase the discriminating power of killer toxin sensitivity in fingerprint of
13 yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 31-36.
- 14 [5] Buzzini, P. and Martini, A., 2001. Discrimination between *Candida*
15 *albicans* and other pathogenic species of genus *Candida* by their
16 differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J. Clin.*
17 *Microbiol.*, **39**, 3362-3364.
- 18 [6] Buzzini P., Berardinelli S., Turchetti B., Cardinali G., et al., 2003.
19 Fingerprint of yeasts at the strain level by differential sensitivity responses
20 to a panel of selected killer toxins. *System. Appl. Microbiol.* **26**, 466-470.
- 21 [7] Buzzini P., Turchetti B., Martini A., 2004. Assessment of
22 discriminatory power of three different fingerprint methods based on killer

- 1 toxin sensitivity for the differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains.
2 *J. Appl. Microbiol.* **96**, 1194-1201.
- 3 [8] Morace G., Dettori G., Sanguinetti M., Manzara S., et al., 1988.
4 Biotyping of aerobic actinomycetes by modified killer system. *Eur. J.*
5 *Epidemiol.* **4**, 99–103.
- 6 [9] Morace G., Manzara S., Dettori G., Fanti F., et al. 1989. Biotyping of
7 bacterial isolates using the yeast killer system. *Eur. J. Epidemiol.* **5**, 303–
8 310.
- 9 [10] Izgu, F. and Altinbay D., 1997. Killer toxins of certain yeast strains
10 have potential growth inhibitory activity on Gram-positive bacteria.
11 *Microbios*, **89**, 15-22.
- 12 [11] Catalano M., 1994. Bacterial genotyping in nosocomial infections.
13 *Medicina* **54**, 596-604.
- 14 [12] Jarlov J., 1999. Phenotypic characteristics of coagulase-negative
15 staphylococci: typing and antibiotic susceptibility. *APMIS Suppl.* **91**, 1-42.
- 16 [13] Muller F.M., Lischewski A., Harmsen D., Hacker J., 1999.
17 Standardized molecular typing. *Mycoses* **42**, 69-72.
- 18 [14] Sloos J.H., Dijkshoorn L., Vogel L., Van Boven C.P.A., 2000.
19 Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the
20 clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in
21 patients with septicemia. *J. Clin. Microb.* **38**, 2488-2493.

- 1 [15] O'Donnell, K., 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: The Fungal
2 Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal
3 Systematics. Reynolds D. R. & Taylor J. W. ed. CAB International,
4 Wallingford, 225-233.
- 5 [16] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., et al., 1997.
6 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database
7 search programs. *NAR*, **25**, 3389-3402.
- 8 [17] Fuentefria A.M., Franskoviaki I., Mercado L., Ramos J., et al., 2006.
9 Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates
10 by two Brazilian killer yeasts. *J. Basic Microbiol.* **2**, 87-93.
- 11 [18] Hunter P., 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power
12 of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1903-1905.
- 13 [19] Takahashi T., Satoh I. And Kikuchi, N., 1999. Phylogenetic
14 relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA
15 gene sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 725-728.
- 16 [20] Kwok A.Y.C., Su S.-C., Reynolds R.P., Bay S.J., et al., 1999.
17 Species identification and phylogenetic relationships based on partial
18 HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst.*
19 *Bacteriol.* **49**, 1181-1192.
- 20 [21] Drancourt M. and Raoult D., 2002. *rpo B* gene sequence-based
21 identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1333-1338.

- 1 [22] Poyart C., Quesne G., Boumaila C. and Trieu-Cuot P., 2001. Rapid
2 and accurate species-level identification of coagulase-negative
3 staphylococci by using the *sod A* gene as a target. *J. Clin. Microbiol.* **39**,
4 4296-4301.
- 5 [23] Chaieb K., Touati A., Salah A.M., Hassen A.B., et al., 2006. DNA
6 fingerprinting of multi-resistant coagulase-negative staphylococci isolated
7 from biomaterials in dialysis services. *Arch. Med. Res.* **37**, 953-960.
- 8 [24] Nunes A.P.F., Teixeira L.M., Bastos C.C.R., Silva M.G., et al., 2005.
9 Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*
10 and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres.
11 *J. Hosp. Infect.* **59**, 19-26.
- 12 [25] Kozitskaya S., Olson M.E., Fey P.D., Witte W., et al., 2005. Clonal
13 analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-
14 mediating genes by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **43**,
15 4751-4757.
- 16 [26] Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Betolotti, D., et al., 1997. Yeast
17 Killer Systems. *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 369-400.
- 18 [27] Hodgson V.J., Button D., Walker G.M., 1995. Anti-*Candida* activity of
19 a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol.* **141**, 2003-
20 2012.

- 1 **Table 1.** Quantitative Data Matrix (QDM) referent to differential growth inhibition haloes of multi-resistant
- 2 *Staphylococcus epidermidis* (SCN/SCNunc) clinical isolates.

		Collection number of the 11 killer yeasts										
		KYQU72, KYQU45, KYQU88, KYQU100 = <i>Trichosporon faecale</i> ; KYLC60, KYLC83, KYQU83 = <i>Trichosporon coremiiforme</i> , KYL102, KYLV127 = <i>Candida catenulata</i> , KYHB55 = <i>Kodamaea ohmeri</i> , KYQU89 = <i>Trichosporon</i> sp. nv.										
Source	Sensitivity strains	KYQU72	KYLC60	KYQU45	KYLC83	KYL102	KYQU127	KYQU89	KYQU88	KYQU83	KYHB55	KYQU100
H1 ^a	SCN156	D ^c	D	D	D	C	D	B	D	D	A	B
H1	SCN167	-	-	B	-	-	B	-	-	A	-	-
H1	SCN136	-	-	-	A	-	B	-	-	-	-	-
H1	SCN165	D	-	-	B	B	-	C	A	-	-	A
H1	SCN120	-	-	B	B	-	D	B	B	-	B	B
H1	SCN179	-	-	-	D	-	-	-	-	B	-	-
H1	SCN147	D	B	C	D	B	A	D	D	D	B	D
H1	SCN128	-	-	-	B	-	A	B	B	-	-	B
H1	SCN166	A	-	D	-	-	B	B	B	B	B	A

H1	SCN181	-	A	B	D	-	D	B	B	-	-	B
H1	SCN180	-	-	-	B	B	B	D	-	-	-	-
H1	SCN173	-	-	-	D	-	D	B	B	B	-	-
H1	SCN172	-	-	A	B	-	B	B	B	D	B	B
H1	SCN168	A	A	-	D	A	B	D	D	D	-	A
H2	SCN1	-	-	-	C	-	D	B	B	B	-	B
H2	SCN 3	-	-	-	D	C	-	D	-	D	-	B
H2	SCN 5	-	D	C	C	-	A	B	A	-	-	-
H2	SCN 6	B	-	-	-	B	D	D	B	-	C	A
H2	SCN 7	-	D	B	B	-	-	C	-	B	-	B
H2	SCN 8	-	-	-	D	B	D	-	D	A	-	-
H2	SCN 9	A	B	-	-	A	-	-	-	A	-	B
H2	SCN 10	-	-	B	A	C	C	-	B	-	A	-
AMB ^B	SCNunc 1	C	-	A	B	-	A	C	B	-	-	A
AMB	SCNunc 2	-	-	-	C	B	-	B	C	-	-	-
AMB	SCNunc 3	-	A	C	A	-	B	-	C	C	-	B
AMB	SCNunc 4	A	-	-	-	A	C	B	-	-	-	C

AMB	SCNunc 5	-	-	-	A	A	C	C	-	-	-	B
AMB	SCNunc 6	A	A	A	B	-	-	-	B	C	A	-
AMB	SCNunc 7	-	B	-	B	B	D	C	C	-	-	B
AMB	SCNunc 8	B	-	B	C	-	B	D	-	-	-	B
AMB	SCNunc 9	-	A	-	-	D	-	D	B	A	-	-
AMB	SCNunc 10	-	-	B	A	B	-	C	B	B	-	A
AMB	SCNunc 11	D	B	-	B	-	A	-	C	B	A	-
AMB	SCNunc 12	-	-	C	C	A	-	D	B	-	-	-
AMB	SCNunc 13	D	B	B	-	B	-	B	-	B	-	A

- 1 a- Hospitals H1 and H2, located at Porto Alegre, RS, Brazil.
- 2 b- Clinical microbiology laboratory
- 3 c- A: 0 - 4mm; B: 5 - 8mm; C: 9 -12mm; D: >12mm
- 4 (-) negative

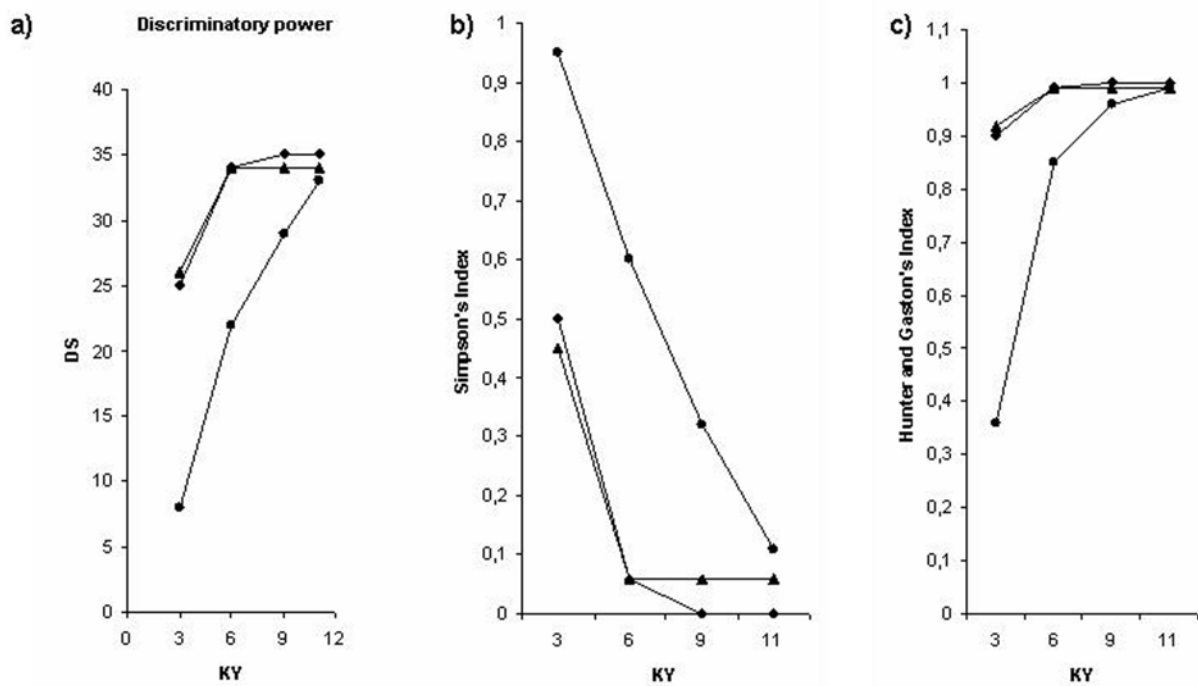


Figure 1. a) Correlation between the number of discriminated strains (DS) of *Staphylococcus epidermidis* and the number of killer yeasts used in binary data matrix (BDM ●), triplet data Matrix (TDM ▲) and quantitative data Matrix (QDM ■). Variation of the indices of Simpson (λ) (b) and Hunter and Gaston (D) (c) in relation to the number of killer yeasts (KY) in BDM, TDM and QDM methods.

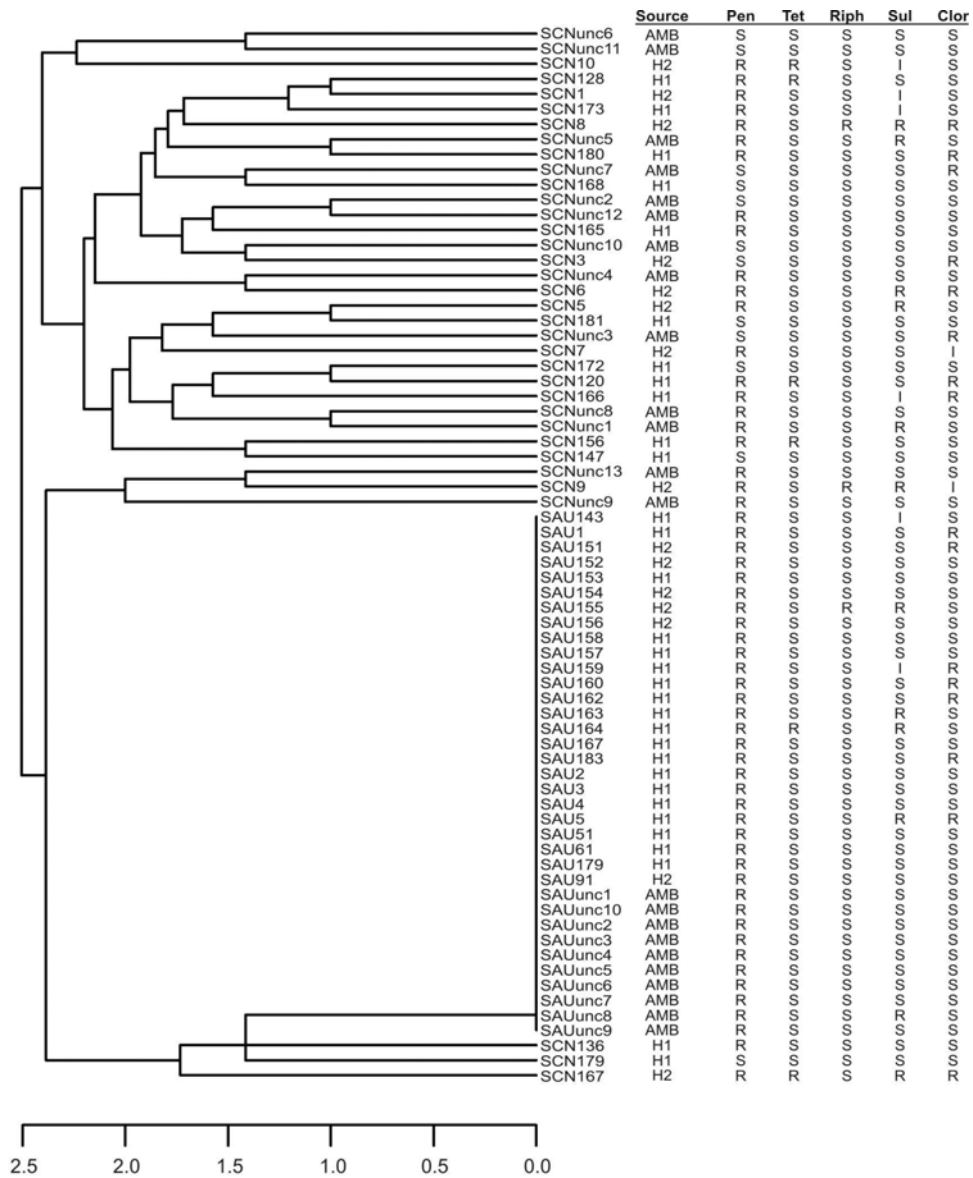


Figure 2. Dendrogram correlating killer sensitivity, isolation source and clinical characteristics of *S. epidermidis* and *S. aureus* analyzed by quantitative data matrix (QDM). Pen, susceptibility to penicillin; Tet, susceptibility to tetracycline; Riph, susceptibility to riphampicin; Sul, susceptibility to sulfamethoxazole; Clor, susceptibility to chloramphenicol; R, resistant; S, sensible; I, intermediary. H1, H2, hospitals (H1 and H2); AMB, clinical microbiological laboratories.

3. CONCLUSÕES FINAIS

O conhecimento obtido neste trabalho pode contribuir para um melhor entendimento do potencial biotecnológico da aplicação das leveduras *killer* como uma ferramenta de biotipagem de microrganismos de interesse clínico, não restrito apenas a leveduras, mas também a procariotos. A seleção de leveduras com um amplo e evidente perfil *killer* (com ação antagonista visível em placa) vem sendo estudada desde o fim da década de 60. Entretanto, linhagens com essas características e alvo de ação em microrganismos de interesse médico não são simples de serem encontradas, o que demanda uma necessidade de testes de triagem em diversos substratos onde as condições ecológicas de crescimento das leveduras sejam favoráveis e, portanto, competitivas (GANTER & STARMER, 1992; GOLUBEV, 1006). Neste estudo nós isolamos e caracterizamos o perfil genético de 32 leveduras *killer* com um amplo espectro de ação antagonista contra linhagens de interesse clínico, além de termos descrito uma nova espécie de levedura basidiomiceto com um amplo e interessante espectro de atuação *killer*.

O mecanismo de ação das leveduras *killer*, embora esteja bem estudado, não está completamente elucidado. A ação das toxinas sobre a parede ou o ciclo celular é restrita a poucas espécies de cepas sensíveis. Neste estudo, foi avaliada a ação de leveduras *killer*, em ensaios célula contra célula, sobre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, além de *S. epidermiditis*.

Com base nos resultados obtidos nesses estudos, concluímos que:

- Foram isoladas 48 linhagens com perfil *killer*, sendo 32 selecionadas para a confirmação da identificação fenotípica pelo método de sequenciamento, e para a caracterização da molécula codificante da característica *killer*, cromossoma ou material extracromossomal.
- O padrão de sensibilidade às diferentes toxinas *killer* foi discriminatório e eficiente para a biotipagem de leveduras de interesse clínico, principalmente em nível intra-específico, permitindo diferenciar cepas da mesma espécie, anteriormente não identificados pelas ferramentas de tipagem molecular.
- Foi desenvolvida uma metodologia de biotipagem de *C. neoformans*, *C. gattii* e *S. epidermiditis* através do uso de painéis contendo leveduras *killer*, aplicável para o monitoramento biológico em ambientes com riscos de disseminação de infecções cruzadas.

4. PERSPECTIVAS

4.1 Purificação da toxina *killer* secretada pela cepa *Trichosporum insectorum* KYQU89.

4.2 Comparação do espectro de ação da toxina purificada com antifúngicos de referência para o tratamento da criptococose.

4.3 Comparação do espectro de ação da toxina purificada com antibacterianos de referência para o tratamento de doenças relacionadas ao *Staphylococcus epidermidis*.

4.4 Purificação das toxinas secretadas pelas leveduras que compuseram os painéis de biotipagem, com o objetivo de compor um kit comercial de uso rápido, sem a necessidade do cultivo da cepa produtora da toxina.

4.5 Análise molecular das glicoproteínas com o objetivo de produção de um análogo sintético para uso comercial em grande escala.

4.6 A análise de cura do fenótipo *killer* em todos os 14 restantes isolados com aparente dsRNA codificantes para a ação antagonista e a confirmação por microscopia eletrônica de transmissão da presença de cápsulas virais no citoplasma dessas leveduras tornam-se importantes perspectivas desse estudo, visto que nas espécies de *Trichosporon* isoladas neste estudo (*T. faecale*, *T. coremiiforme*, *T. insectorum* e *T. japonicum*) não há descrição nem caracterização desse genótipo ainda.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFE, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402, 1997.

BARTUNEK, M.; JELINEK, O.; VONDREJS, V. Susceptibility of Individual Cells of *Saccharomyces cerevisiae* to the Killer Toxin K1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 283: 526 – 530, 2001.

BEVAN, E.A. & MAKOWER, M. The physiological basis of the killer-character in yeast. in *Genetics Today, XIth International Congress of Genetics* Vol. 1 (ed. Geerts, S.J.) 202–203 (Pergamon Press, Oxford, 1963).

BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 35: 147-149, 1997.

BREINIG, F.; TIPPER, D.J.; SCHMITT, M.J. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell*. 108: 395 - 405, 2002.

BUZZINI, P.; CORAZZI, L.; TURCHETTI, B.; BURATTA, M.; MARTINI, A. Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from

Williopsis saturnus DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters*. 238: 359 - 365, 2004.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from Brazilian rain Forest. *Canadian Journal of Microbiology*. 46: 607 - 611, 2000.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 3362 - 3364, 2001.

BUZZINI, P.; BERARDINELLI, S.; TURCHETTI, B.; CARDINALI, G.; MARTINI, A. Fingerprint of yeasts at the strain level by differential sensitivity responses to a panel of selected killer toxins. *Systematic and Applied Microbiology*. 26: 466 - 470, 2003.

BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; VAUGHAN-MARTINI, A. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Research*. IN PRESS, 2007.

CASTON, J.R.; TRUS, B.L.; BOOY, F.P.; WICKNER, R.B.; WALL, J.S.; STEVEN, A.C. Structure of L-A virus: A specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *Journal of Cell Biology*. 138: 975 - 985, 1997.

CASTORIA R.; CURTIS F.; LIMA G., CAPUTO L.; PACIFICO S.; dE CICCIO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Biology and Technology*. 22: 7 - 17, 2001.

CENCI, E.; BISTONI, F.; MENCACCI, A.; PERITO, S.; MAGLIANI, W.; CONTI, S.; POLONELLI, L. Vecchiarelli, A. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Current Microbiology*. 6: 953 - 961, 2004.

CHENG, Y.; McNALLY, D.J.; LABBE, C.; VOYER, N.; BELZILE, F. Insertional mutagenesis of a fungal biocontrol agent led to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity *Applied Environmental Microbiology*. 69: 2595 - 2602, 2003.

CIANI, M.; FATICHENTI, F. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3058 - 3063, 2001.

COMITINI, F.; DI PIETRO, N.; ZACCHI, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology*. 150: 2535 - 2541, 2004.

CRISEO, G.; GALLO, M.; PERNICE, A. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. *Mycoses*. 42: 601-608, 1999.

FANTI, F.; CONTI, S.; CAMPANI, L.; MORACE, G.; DETTORI, G; POLONELLI, L. Studies on the epidemiology of *Aspergillus fumigatus* infections in a university hospital. *European Journal of Epidemiology*. 5: 8-14, 1989.

FELL, J.W. (eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, fourth edn., Elsevier, Amsterdam, pp. 854–872, 2000.

FLEGELOVÁ, H.; NOVOTNÁ, D.; VOJÍSKOVÁ, K.; JANDEROVÁ, B. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different degree of resistance to killer toxins K1 and K2. *FEMS Yeast Research*. 2: 73 - 79, 2002.

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M.E. LINGSTEN, K.J.; SCHNÜRER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Research*. 2: 395 - 402, 2002.

FUENTEFRIA, A.M.; FRANSKOVIKI, I.; MERCADO, L.; RAMOS, J.P.; VAINSTEIN, M.H.; VALENTE, P. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* by two killer yeast isolates from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. *Journal of Basic Microbiology*. 2: 87 - 93, 2006.

GANTER, P.F. & STARMER, W.T. Killer factor as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. *Ecology*. 73: 54–67, 1992.

GOLUBEV, W.; SHABALIN, Y. Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiology Letters*. 119: 105 - 110, 1994.

GOLUBEV, W.I. Mycocins (killer toxins). *The Yeasts. A taxonomy Study* (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 55–62. Academic Press, London, UK, 1998.

GOLUBEV, W.; KULAKOVSKAYA T.V.; GOLUBEVA, E.W. Antifungal glycolipid production in *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821. *Mikrobiologiya*. 70: 642 - 646, 2001.

GOLUBEV; W.; PFEIFFER, I.; GOLUBEVA, E.W. Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. *FEMS Microbiology Ecology*. 40: 151 - 157, 2002.

GOLUBEV, W.; PFEIFFER, I.; CHURKINA, L.; GOLUBEVA, E.W. Double-stranded RNA viruses in a micocinogenic strain of *Cystofilobasidium infirmominiatum*. *FEMS Yeast Research*. 3: 63 - 68, 2003.

GOLUBEV, W.; KULAKOVSKAYA T.V.; GOLUBEV, NW. Fungicidal activity of extracellular glycolipid of *Sympodiomyces paphiopedili*. *Mikrobiologiya*. 73: 841 - 845, 2004.

GOLUBEV, W.I. Antagonistic interactions among yeasts. *The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (Rosa CA & Peter G, eds), pp. 197 – 219. Springer, Berlin, Germany, 2006.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Ed. CAB International, 8^a edição, 1995, 616p.

IZGU, F.; ALTINBAY, D. Isolation and characterization of the K5-type yeast *killer* protein and its homology with an Exo- β -1,3-glucanase. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 68: 685 - 693, 2004.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; SERTKAYA, A. Enzymic activity of the K5-type yeast *killer* toxin and its characterization. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 69: 2200 - 2206, 2005.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; TÜRELI, AE. In vitro activity of panomycocin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. *Mycoses*. 50: 31 - 34, 2007.

JARLOV, J. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility. *APMIS Suppl.* 91: 1 - 42, 1999

KESZTHELYI, A.; OHKUSU, M.; TAKEO, K.; PFEIFFER, I.; LITTER, J.; KUCSERA, J. Characterisation of the anticryptococcal effect of the FC-1 toxin produced by *Filobasidium capsuligenum*. *Mycoses*. 49: 176 - 183, 2006.

KLASSEN, R.; MEINHARDT, F. Linear plasmids pWR1A and pWR1B of the yeast *Wingea robertsiae* are associated with a *killer* phenotype. *Plasmid*. 48: 142 - 148, 2002.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Arizona, 2001.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J. The yeasts, A taxonomic study. 4th ed. Elsevier Science Publishers, 1998, 1088p.

LANDELL, M.F. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas de Bromélias na praia da Pedreira, Parque Itapuã/RS. Dissertação de mestrado. Porto Alegre, 2005.

LANDELL, M.F.; HARTFELDER, C.; VALENTE, P. Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34: 49 - 55, 2006.

LOWES K. F.; SHEARMAN C.A.; PAYNE J.; MCKENZIE D.; ARCHER D.B.; MERRY R.J.; GASSON M.J. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1066 - 1076, 2000.

LLORENTE, P.; MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J.M.; SPENCER-MARTINS, I. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1165 - 1167, 1997.

MAGLIANI W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BETOLOTTI, D.; POLONELLI L.; Yeast Killer Systems. *Clinical Microbiology Reviews*. 10: 369 - 400, 1997.

MAGLIANI, W; CONTI, S; SALATI, A; VACCARI, S; RAVANETTI, L; MAFFEI, DL; POLONELLI, L. Therapeutic potential of yeast *killer* toxin-like antibodies and mimotopes. *FEMS Yeast Research*. 5: 11 - 18, 2004.

MAXWELL, M.J., MESSER, S.A., HOLLIS, R.J., *et al.* Evaluation of E-test method for determining voriconazole and amphotericin B MICs for 162 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 97-99, 2003.

MEINHARDT, F.; SCHAFFRATH, R.; LARSEN, M. Microbial linear plasmids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47: 329 – 336, 1997.

MIDDELHOVEN, W.J.; SCORZETTI, G., FELL, J.W. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 975-986, 2004.

MULLER, F.M.; LISCHEWSKI, A.; HARMSEN, D.; HACKER, J. Standardized molecular typing. *Mycoses*. 42: 69 - 72, 1999.

NOVOTNÁ, D.; FLEGELOVÁ, H.; JANDEROVÁ, B. Different action of *killer* toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 4(8): 803 - 813, 2004.

PEREZ, M.; GALLEGU, F; HIDALGO, P. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters*. 205: 375 – 378, 2001.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSACCI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. *Killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *Jornal of Clinical Microbiology*. 17: 774 – 780, 1983.

PUCHKOV, E.; WIESE, A.; SEYDEL, U.; KULAKOVSKAYA, T. Cytoplasmic membrane of a sensitive yeast is a primary target for *Cryptococcus humicola* mycocidal compound (microcin). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1515: 239 - 250, 2001.

PUCHKOV, E.; ZHRINGER, U.; LINDNER, B.; KULAKOVSKAYA, T.; SEYDEL, U.; WIESE, A. Mycocidal, membrane-active complex of *Cryptococcus humicola*, a new type of cellobiose lipid with detergent features. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1558: 161-170, 2002.

SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*. 150: 2527 - 2534, 2004a.

SANTOS, A.; MARQUINA, D. Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast*. 21: 151 - 162, 2004b.

SANTOS, A.; MARQUINA, D.; BARROSO, J.; PEINADO, J.M. (1-6)- β -D-Glucan as cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Letters in Applied Microbiology*. 34: 95 - 96, 2002.

SANTOS, A.; MARQUINA, D.; LEAL, J.A.; PEINADO, J.M. (1-6)- β -D-Glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1809 - 1813, 2000.

SÉGUY N.; POLONELLI L.; DEI-CAS E.; CAILLIEZ J. Effect of a *killer* toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*: Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 22: 145 - 149, 1998.

SCHMITT, M.J.; KLAVEHN, P.; WANG, J.; SCHONIG, I.; TIPPER, D.J. Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*. 142: 2655 - 2662, 1996.

SCHMITT M. J.; BREINIG F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*. 4: 212-221, 2006.

SCHMITT M. J.; BREINIG F. The viral *killer* system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*. 26: 257 - 276, 2002.

SCHAFFRATH, R.; BREUNIG, K.D. Genetics and molecular physiology of the yeasts *Kluyveromyces lactis*. *Fungal and Genetics Biology*. 30: 173-190, 2000.

SLOOS, J.H.; DIJKSHOORN, L.; VOGEL, L.; VAN BOVEN, C.P.A. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *Journal Clinical Microbiology*. 38: 2488 - 2493, 2000.

SOARES, G.; SATO, H. *Killer* toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against Fleischmann and Itaiquara commercial brands of yeast. *Revista de Microbiologia*. 30: 253 - 257, 1999.

SPANAMBERG, A.; HARTFELDER, C.; FUENTEFRIA, A. M.; VALENTE, P. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in South Brazil. *Acta scientiae Veterinariae*. 32: 195 - 199, 2004.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882, 1997.

TRAVASSOS, L.R.; SILVA, L.S.; RODRIGUES, E.G.; CONTI, S.; SALATI, A.; MAGLIANI, W.; POLONELLI, L. Therapeutic activity of a *killer* peptide against experimental paracoccidioidomycosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 956 – 958, 2004.

VADASZ, A.S.; JAGGANATH, D.B.; PRETORIUS, I.S. Electron microscopy of the K2 killer effect of *Saccharomyces cerevisiae* T206 on a mesophilic wine yeast. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 117–122, 2000.

WEILER, F.; SCHMITT, M.J. Zygoicin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Research*. 3: 69 - 76, 2003.

WICKNER, R. B. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*.
Microbiology Review. 60: 250 – 265, 1996.

6. ANEXOS

ANEXO 1

LISTAGEM DOS MEIOS DE CULTURA

Ágar YEPG	2% de glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 2% de Ágar
Caldo YEPG	2% de glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura
Ágar GYMP	2% de glicose; 2% de extrato de malte; 0,5% de extrato de levedura; 0,2% de fosfato de sódio monobásico; 2% de Ágar
Meio YM-MB	0,3% de extrato de levedura; 0,3% de extrato de malte; 0,5% de peptona; 1% de glicose; 2% de Ágar; 0,003% de azul de metileno; pH 5.0

ANEXO 2

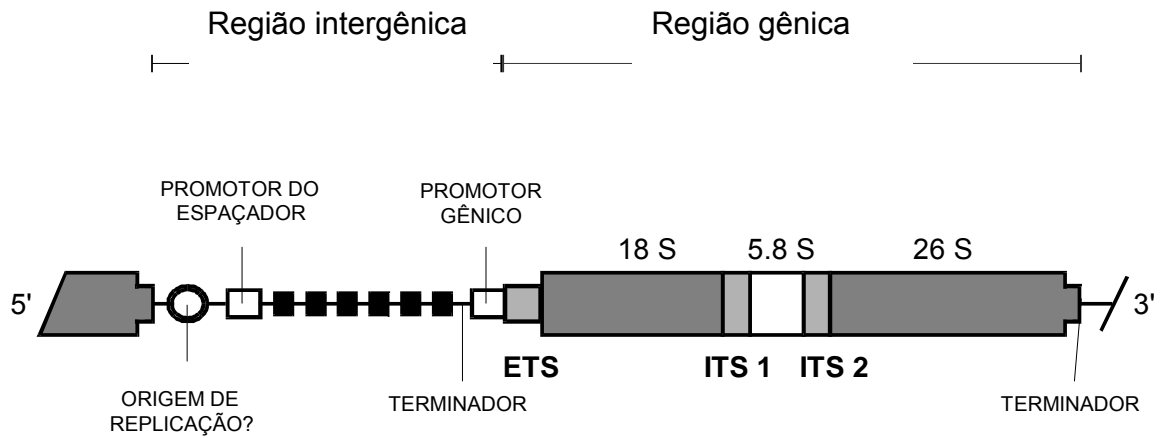


Figura 2: rDNA em eucariontes segundo Reeder (1989).

CURRICULUM VITÆ RESUMIDO

FUENTEFRIA, A. M.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Alexandre Meneghello Fuentefria

Filiação: Renato Riccardi Fuentefria e Branca Meneghello Fuentefria

Nascimento: 29/09/1977 - Cachoeira do Sul/RS - Brasil

RG: 6054718298 SSP - RS CPF: 80430899068

Endereço residencial

Rua Orestes Farina 73/204; Concórdia, SC CEP: 89700-000

Telefone: 49 34449881 / 49 99649086 / 51 81818716

Endereço profissional

Fundação Universidade do Contestado - Campus de Concórdia,

Rua Victor Sopelsa, 3000 Bairro Salete - Concórdia, SC - Brasil

CEP: 89700-000 Telefone: 49 34411000

Endereço eletrônico

amf77@terra.com.br

2. FORMAÇÃO:

2005 - 2007 Doutorado em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM/UFRGS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre,
Brasil

Título: Caracterização molecular e morfológica de leveduras *killer* e sua
aplicação em processos biotecnológicos

Orientador: Marilene Vainstein

2003 - 2004 Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre,
Brasil

Título: Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de
leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados do filoplano de
Hibiscus rosa-sinensis, Ano de obtenção: 2004

Orientador: Patrícia valente da Silva

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico

1997 - 2002 Graduação em Farmácia.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre,
Brasil

3. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Fundação Universidade do Contestado - UNC

Vínculo institucional

2005 - Atual

Enquadramento funcional 1: **Vice-coordenador do curso de Farmácia**

Enquadramento funcional 2: **Professor universitário**

Professor titular de Microbiologia clínica

Professor titular de Genética Molecular

Professor titular de Patologia

Professor titular de Toxicologia clínica

Professor titular de Enzimologia e tecnologia de fermentações

Professor titular de Metodologia de pesquisa

Universidade Comunitária Regional de Chapecó - UNOCHAPECO

Vínculo institucional

2006 - Atual

Enquadramento funcional: **Professor Universitário**

Professor titular de Microbiologia clínica

Professor titular de Micologia clínica

Professor titular de Toxicologia clínica
Professor titular de Infectologia

Laboratório ANALIC CHAPECÓ de Análises Clínicas Ltda.

Vínculo institucional:

2006 - Atual Enquadramento funcional: **Diretor técnico**

ALM Laboratório de Análises Clínicas Ltda. Franquia Grupo Weinmann

Vínculo institucional:

2004 - 2006 Enquadramento funcional: **Diretor técnico**

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. FUENTEFRIA, A. M., Suh, S., LANDELL, Melissa, FAGANELLO, J., SCHRANK, Augusto, Blackwell, M., VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patrícia. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast.. *Mycological Research*. no prelo, 2007.
2. FUENTEFRIA, A. M., FAGANELLO, J., SCHRANK, Augusto, VALENTE, Patrícia, VAINSTEIN, Marilene H. Typing and patterns of cellular morphological alterations in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates exposed to a panel of killer yeasts.. *Medical Mycology*. no prelo, 2007.
3. FUENTEFRIA, A. M., PEREZ, Leandro Reus Rodrigues, AZEVEDO, Pedro, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning, VALENTE, Patrícia. Typing of *Staphylococcus epidermidis* clinical strains by a selected panel of Brazilian killer yeasts. *Journal of Basic Microbiology*. aceito, 2007.
4. FUENTEFRIA, A. M., FRANSKOVIKI, Inélia, MERCADO, Luisa W, RAMOS,

Jesus P, VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patrícia. Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* strains by two Brazilian killer yeasts. *Journal of Basic Microbiology*. , v.46, p.87 - 93, 2006.

5. LETTIERI, Mário, Flores, R., FUENTEFRIA, A. M. Prevalência de Enteroparasitas em Crianças de uma Creche na Cidade de Concórdia, Brasil. *Newslab*. , v.78, p.110 - 116, 2006.

6. MORAES, Cristiane da Rosa, FUENTEFRIA, A. M., ZAFFARI, Cristina, CONTE, Márcia, ROCHA, José Pedro Vianna, SPANAMBERG, Andréia, VALENTE, Patrícia, CORÇÃO, Gertrudes, COSTA, Marisa da Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.. *Acta Scientiae Veterinariae*. , v.33, p.259 - 264, 2005.

7. FUENTEFRIA, A. M., VALENTE, Patrícia Screening of enzyme-producing yeast and yeast-like fungi from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. *Tecnologia*. , v.9, p.9 - 25, 2005.

8. SPANAMBERG, Andréia, HARTFELDER, Claudia, FUENTEFRIA, A. M., VALENTE, Patrícia. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in South Brazil. *Acta scientiae Veterinariae* , v.32, p.195 - 199, 2004.

9. FUENTEFRIA, A. M., OPPE, Tércio. Controle de qualidade de cápsulas de cálcio (500mg) e de cálcio de ostras (500mg) produzidas em farmácias magistrais. *Caderno de Farmácia*. v.18. p.128, 2002.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. FUENTEFRIA, A. M., TEIXEIRA, M. L., FAGANELLO, J.

Estudo dos fatores prevalentes nas prescrições de marcadores tumorais na região do

vale do Paranhana, Rio Grande do Sul, Brasil In: Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2006, Curitiba. **33 Congresso Brasileiro de Análises Clínicas.** , 2006.

2. BUSSAMARA, Roberta, FUENTEFRIA, A. M., SILVA, E., Valente, P., VAINSTEIN, Marilene Henning. Produção e imobilização da lipase de *Pseudozyma hubeiensis* para utilização em aplicações biotecnológicas In: ENZITEC, 2006, Caxias do Sul / RS.

VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. , 2006.

3. FUENTEFRIA, A. M., VALENTE, Patrícia, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene

Caracterização molecular e morfológica de leveduras killer e sua aplicação em processos biotecnológicos In: VII Reunião Anual do PPGBCM do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre.

4. FUENTEFRIA, A. M., SEBOLT, Marcelo, SPANAMBERG, Andréia, HARTFELDER, Cláudia, LANDELL, Melissa, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene, VALENTE, Patrícia

Frequência e caracterização genética do fenômeno killer em leveduras associadas a produtos lácteos In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.

5. FRANCO, Márcia, FUENTEFRIA, A. M., LANDELL, Melissa, VALENTE, Patrícia
Inibição de leveduras patogênicas humanas por leveduras killer isoladas de diferentes substratos In: XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006, POA.

6. CRESTANI, Juliana, FUENTEFRIA, A. M., VAINSTEIN, Marilene Henning.
Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* e outras leveduras de uma madeireira , baseado em um relato de caso de criptococose. In: VII Reunião Anual do PPGBCM do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre.

7. FUENTEFRIA, A. M., PEREZ, Leandro Reus Rodrigues, AZEVEDO, Pedro, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene, VALENTE, Patrícia. Poder discriminatório de um método fenotípico de tipagem de isolados clínicos de *Staphylococcus* coagulase-negativo multi-resistentes utilizando um painel de leveduras killer. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos.
8. LANDELL, Melissa, MAUTONE, Juliana, FUENTEFRIA, A. M., VALENTE, Patrícia. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas de Bromélias na praia da Pedreira, Parque Itapuã/RS In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto.
9. SPANAMBERG, Andréia, FUENTEFRIA, A. M., FRANSKOVIKI, Inélia, MERCADO, Luisa, VALENTE, Patrícia. Contagem e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras isoladas do leite bovino in natura no Rio Grande do Sul In: XVI Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 2004, Passo Fundo/RS.
10. CORBELLINI, Valeriano, FUENTEFRIA, A. M., VALENTE, Patrícia, SCROFERNEKER, Maria Lúcia. Detecção da atividade nitrorredutase de leveduras sobre 6-Nitrocumarina por cromatografia em camada delgada In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto.
11. SPANENBERG, Andréia, HARTFELDER, Cláudia, FUENTEFRIA, A. M., VALENTE, Patrícia. Diversidade de leveduras isoladas do leite in natura no sul do Brasil In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto.
12. SPANENBERG, Andréia, HARTFELDER, Cláudia, FUENTEFRIA, A. M., VALENTE, Patrícia. Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras isoladas do leite in natura In: XVI Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre.

13. FUENTEFRIA, A. M., FRANSKOVIKI, Inélia, MERCADO, Luisa, RAMOS, Jesus P, VALENTE, Patrícia. Identificação fenotípica e molecular de cepas leveduriformes com capacidade antagonista contra fungos patogênicos humanos In: XIV Reunião de Genética de Microrganismos, 2004, Gramado/RS.

14. FRANSKOVIKI, Inélia, FUENTEFRIA, A. M., MERCADO, Luisa, VALENTE, Patrícia. Inibição de fungos patogênicos humanos e fitopatogênicos por leveduras isoladas de folhas do Hibiscus rosa-sinensis In: XVI Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre.

15. FUENTEFRIA, A. M., VALENTE, Patrícia. Plant cell-wall hydrolyzing potential of yeast and yeast-like fungi isolated from phylloplane of Hibiscus rosa-sinensis in Brazil In: 11th International Congress on yeasts, 2004, Rio de Janeiro.

16. GERMANO, Fernando, FUENTEFRIA, A. M., FRANSKOVIKI, Inélia, MERCADO, Luisa, VALENTE, Patrícia. Atividade antagonista contra fungos patogênicos humanos de cepas leveduriformes isoladas do filoplano de Hibiscus sp In: XXIII Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2003, Porto Alegre/RS.

17. FUENTEFRIA, A. M., FRANSKOVIKI, Inélia, MERCADO, Luisa, GERMANO, Fernando, SILVA, Paulo Roberto Bernardes da, VALENTE, Patrícia. Atividade antagonista contra fungos patogênicos humanos de cepas leveduriformes isoladas do filoplano de Hibiscus sp In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, Florianópolis.

18. FUENTEFRIA, A. M., GERMANO, Fernando, FRANSKOVIKI, Inélia, MERCADO, Luisa, SILVA, Paulo Roberto Bernardes da, VALENTE, Patrícia. Detecção de enzimas extracelulares de cepas leveduriformes isoladas do filoplano de Hibiscus sp In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003,

Florianópolis/SC.

19. FRANSKOVIKI, Inélia, FUENTEFRIA, A. M., MERCADO, Luisa, VALENTE, Patrícia. Inibição de fungos patogênicos humanos por leveduras micocinogênicas isoladas do filoplano de Hibiscus sp. In: XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2003, Porto Alegre/RS.