

## ARTIGOS

# DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS* PELO SISTEMA *KILLER*

Regina Celia Candido, Olga Fischman, Luiz Zaror e Izabel Yoko Ito

Foi estudado o efeito *killer* de 9 cepas padrão de leveduras sobre 146 amostras de *Candida albicans* isoladas dos seguintes espécimes clínicos: mucosa bucal, fezes, lavado brônquico, escarro, secreção vaginal, urina, lesão de pele, lesão de unha e sangue. Usando este sistema foi possível diferenciar 23 biotipos de *C. albicans*. Os biotipos 211, 111 e 811 foram os mais freqüentemente isolados. A maioria das amostras de *C. albicans* (98,6%) foi sensível a pelo menos uma ou mais das 9 cepas *killer*. Empregando-se este sistema foi possível demonstrar que 2 pacientes albergavam mesmo biotipo *killer*, respectivamente, 111 e 211, em diferentes espécimes clínicos, e em outro paciente, o mesmo biotipo (211) foi isolado de hemoculturas realizadas em ocasiões distintas. O uso do sistema *killer* para diferenciar os tipos entre as espécies de leveduras patogênicas, pode ser um método útil para estabelecer a eventual fonte de infecção, constituindo uma ajuda valiosa para o controle e vigilância de infecções nosocomiais causadas por leveduras.

Palavras-chaves: Sistema *killer*. Biotipagem. *Candida albicans*. Epidemiologia.

Algumas leveduras secretam substância com atividade antifúngica de natureza protéica, letal para microrganismos da mesma espécie e gênero e de outros gêneros<sup>1</sup>. Esta substância é comumente denominada como fator *killer*, toxina *killer* ou proteínas *killer*. Termos como zimocina ou micocina também têm sido empregados<sup>1</sup>.

Polonelli e cols<sup>8</sup>, em 1983, preconizaram um método de biotipagem de leveduras denominado de sistema *killer*, codificado em 3 dígitos, cujos resultados são representados pela sensibilidade da cepa em análise, frente a 9 cepas padrão *killer*, pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula*. Esse sistema pode ser empregado em inquéritos epidemiológicos para investigar a origem e/ou caracterização das cepas de leveduras<sup>3, 6, 8, 9</sup> e mais recentemente de *Nocardia*<sup>12</sup>.

A presente publicação apresenta os resultados da caracterização de 146 amostras

de *C. albicans* segundo a biotipagem pelo sistema *killer*.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Amostras de leveduras.* Cento e quarenta e seis cepas de *C. albicans* isoladas dos seguintes espécimes clínicos: mucosa bucal (39), fezes (35), lavado brônquico (26), escarro (12), secreção vaginal (10), urina (8), lesão de pele (8), lesão de unha (4) e sangue (4), foram identificadas de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas conforme Van der Walt e Yarrow<sup>13</sup>.

*Biotipagem.* As cepas foram biotipadas segundo o sistema *killer* proposto por Polonelli e cols<sup>8</sup>.

Cultivos recentes de *C. albicans* foram semeados em tubos contendo 10ml de caldo Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD), mantidos em agitador, a 120rpm, durante 18 horas, a 25°C. Após este período, 1ml dos cultivos diluído em 10ml de caldo YEPD e 1,0ml dessa suspensão adicionado em 20ml de ágar YEPD fundido e resfriado à aproximadamente 50°C. Após agitação vigorosa, o meio inoculado foi vertido em placas de Petri e deixado solidificar. Cultivos recentes das 9 cepas padrão produtoras de toxinas *killer* (K1 a 9; Tabela 1) foram, então, semeados, aplicando uma gota de suspensão das amostras, em caldo YEPD, substituindo a semeadura em estrias de Polonelli e cols<sup>8</sup>. As placas foram incubadas a 25°C, por 72 horas.

Laboratório de Micologia da Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP.

Auxílio: CNPq

Endereço para correspondência: Dra. Regina Celia Candido. Dept<sup>o</sup> de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Av. do Café s/n. 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brasil. Fax (016) 633-1092.

Recebido para publicação em 11/01/95.

Tabela 1 - Cepas padrão produtoras de toxinas killer pertencentes ao elenco de Polonelli.

Código	Cepa	Especificação
K1	<i>Hansenula sp</i>	Stumm 1034
K2	<i>Picbia sp</i>	Stumm 1035
K3	<i>Hansenula anomala</i>	UM Milano
K4	<i>Hansenula anomala</i>	CBS 5759
K5	<i>Hansenula anomala</i>	Ahearn UN 866
K6	<i>Hansenula californica</i>	Ahearn WC 40
K7	<i>Hansenula canadensis</i>	Ahearn WC 41
K8	<i>Hansenula dimmenae</i>	Ahearn WC 44
K9	<i>Hansenula mrakii</i>	Ahearn WC 51

Tabela 3. Porcentagem de sensibilidade de 146 *C. albicans* às toxinas killer produzidas por 9 cepas padrão.

Código	Cepa	Sensibilidade (%)
K1	<i>Hansenula sp</i>	80,8
K2	<i>Picbia sp</i>	82,2
K3	<i>Hansenula anomala</i>	26,7
K4	<i>Hansenula anomala</i>	93,2
K5	<i>Hansenula anomala</i>	93,8
K6	<i>Hansenula californica</i>	88,4
K7	<i>Hansenula canadensis</i>	91,8
K8	<i>Hansenula dimmenae</i>	92,5
K9	<i>Hansenula mrakii</i>	95,2

Foram consideradas sensíveis (+), as cepas que produziram um halo incolor e/ou zona de crescimento com colônias azuis, ao redor do ponto de inoculação das cepas padrão.

Para codificar, foi utilizado o sistema mnemônico proposto por Polonelli e cols<sup>8</sup>, composto de 3 dígitos, representando cada um, a combinação dos resultados obtidos no conjunto de 3 cepas padrão como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Modelos de biotipos killer segundo Polonelli e cols<sup>8</sup>.

Atividade do 1º tríplice				Atividade do 2º tríplice				Atividade do 3º tríplice			
Leveduras				Leveduras				Leveduras			
K1	K2	K3	código	K4	K5	K6	código	K7	K8	K9	código
+	+	+	1*	+	+	+	1*	+	+	+	1*
+	+	-	2**	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4**	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8**

\* biotipo 111; \*\* biotipo 248

Tabela 4 - Distribuição dos 23 modelos killer das 146 cepas de *C. albicans* isoladas de espécimes clínicos.

Modelo	Cepas	
	Nº	%
111	33	22,6
121	1	0,7
211	69	47,3
212	1	0,7
213	1	0,7
221	1	0,7
254	1	0,7
257	1	0,7
261	3	2,0
284	1	0,7
287	4	2,7
312	1	0,7
411	2	1,4
511	1	0,7
617	1	0,7
627	1	0,7
711	2	1,4
811	15	10,3
812	2	1,4
817	1	0,7
821	1	0,7
822	1	0,7
888	2	1,4
Total	23	146
		100,0

## RESULTADOS

A sensibilidade das amostras de *C. albicans* às cepas padrão produtoras de toxinas killer (k1 a 9) variou entre 26,7 a 95,2% (Tabela 3). Os modelos 211 (47,3%), 111 (22,6%) e 811 (10,3%) representaram 80,2% dos 23 biotipos identificados entre as 146 amostras de *C. albicans* analisadas (Tabela 4).

Aplicando o sistema killer a 15 amostras de *C. albicans* isoladas de 6 pacientes em diferentes ocasiões e/ou diferentes espécimes clínicos na mesma ocasião, foram obtidos mesmos biotipos killer em 3 pacientes (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos modelos killer de 15 amostras de *C. albicans* isoladas de 6 pacientes em diferentes ocasiões.

Paciente	Material biológico	Modelo killer
1	Escarro	211
	Mucosa bucal	211
2	Escarro	812
	Lavado brônquico	811
3	Lavado brônquico	261
	Lavado brônquico	221
4	Pele	822
	Pele	811
	Pele	211
5	Pele	261
	Sangue	211
	Sangue	211
6	Urina	111
	Lavado brônquico	111
	Sangue	111

## DISCUSSÃO

Após a descrição do fenômeno *killer* em *Saccharomyces cerevisiae*, por Bevan & Makover em 1963<sup>2</sup>, várias pesquisas têm sido realizadas para verificar a incidência de leveduras produtoras de toxinas *killer*<sup>4</sup>, sensibilidade a toxinas *killer*<sup>8 11 14</sup>, mecanismo de ação dessas toxinas<sup>5</sup>, suas propriedades fisiológicas e químicas<sup>7 10</sup> e, mais recentemente, o seu uso como marcador epidemiológico<sup>8 11</sup>.

A biotipagem de 146 cepas de *C. albicans* evidenciou 23 diferentes modelos *killer*. Polonelli e cols<sup>8</sup>, Caprilli e cols<sup>3</sup>, Margaró e cols<sup>6</sup> e Zaror e cols<sup>14</sup>, registraram, respectivamente, 25, 7, 3 e 48 diferentes tipos, utilizando o mesmo elenco de cepas padrão *killer*. Oito dos 23 modelos *killer* também foram registrados em outros países; 6 na Itália<sup>3 8</sup>, 5 na Argentina<sup>6</sup> e 6 no Chile<sup>14</sup>, o que sugere a sua distribuição cosmopolita.

A quase totalidade das cepas (98,6%) foi sensível a uma ou mais toxinas *killer*, confirmando a verificação de outros pesquisadores<sup>3 6 8 14</sup>.

O modelo 211 foi prevalente em 47,3% de nossas amostras, sendo o 2º em frequência nas investigações de Caprilli e cols<sup>3</sup> na Itália, mas muito pouco comum nas pesquisas de Polonelli e cols<sup>8</sup> no mesmo país e Zaror e cols<sup>14</sup> no Chile. O biotipo 111, identificado em 22,6% do nosso material (Tabela 4) foi o tipo prevalente na Itália<sup>3 8</sup> e na Argentina<sup>6</sup>.

Não foi evidenciada correlação entre os tipos *killer* e a origem do material biológico de procedência das amostras, o que concorda com outros pesquisadores<sup>8</sup>. No entanto em dois pacientes (pac. 1 e 6) foram observados mesmo biotipo em diferentes espécimes clínicos, enquanto que, no paciente 5 o modelo 211 foi obtido do mesmo material clínico em diferentes ocasiões. Esses dados demonstram o valor dessa metodologia na investigação epidemiológica.

O método *killer* é prático, econômico, não requer equipamento sofisticado, de fácil interpretação, e sua aplicação como marcador epidemiológico tem sido preconizada, em casos presuntivos de infecções fúngicas nosocomiais<sup>8</sup>. Concordamos com Provost e cols<sup>12</sup>, quanto a recomendação do sistema *killer* para a identificação rápida e precisa das cepas isoladas em laboratórios de pequeno porte.

## SUMMARY

The authors studied the killer effect of nine standard strains of yeasts on 146 samples of *Candida albicans* isolated from the following clinical specimens: oral mucosa, feces, bronchial wash, sputum, vaginal secretion, urine, skin lesion, nail lesion and blood. Using this system it was possible to differentiate 23 biotypes of *Candida albicans*. The biotypes 211, 111 and 811 were most frequently isolated. Most of the samples of *C. albicans* (98.6%) were sensitive to at least one or more of the nine killer strains. Using the killer system it was possible to show that two patients harbored the same killer biotypes, 111 and 211, respectively, in different clinical specimens and another patient harbored the same biotype (211) in bloodcultures effected in different occasions. The utilization of the killer system to differentiate types among species of pathogenic yeasts can be a useful method to establish the eventual source of infection, and it is a valuable tool to control and watch for nosocomial infections caused by yeasts.

Key-words: Killer system. Biotyping. *Candida albicans*. Epidemiology.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bendová O. The killer phenomenon in yeasts. *Folia Microbiologica* 31:422-43, 1986.
2. Bevan EA, Makower M. The physiological basis of the killer character in yeast. In: Geerts SJ (ed) *Genetics today*. XI<sup>th</sup> International Congress on Genetics 1:202-203, 1963.
3. Caprilli F, Prignano G, Latella C, Tavarozzi S. Amplification of the killer system for differentiation of *Candida albicans* strains. *Mikosen* 28:569-573, 1985.
4. Castilho GJC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Detecção de leveduras produtoras de fator *killer* presentes nas bebidas "chica" e "masato". *Revista de Microbiologia* 211:171-173, 1990.
5. Kagan BL. Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature* 302:709-711, 1983.
6. Magaró HM, Biasoli MS, Bracalenti BJC. Sistema "killer" en cepas de *Candida albicans*: parte II. *Boletim Micologia* 4:73-76, 1989.
7. Palfree RG, Bussey H. Yeast killer toxin: purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal Biochemistry* 93:487-493, 1979.
8. Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. Killer system: a simple method for differentiating

- Candida albicans* strains. *Journal Clinical Microbiology* 91:175-179, 1983.
9. Polonelli L, Castagnola M, Rossetti DV, Morace G. Use of *killer* toxins for computer - aided differentiation of *Candida albicans* strains. *Mycopathologia* 91:175-179, 1985.
  10. Polonelli L, Morace G. Production and characterization of yeast *killer* toxin monoclonal antibodies. *Journal Clinical Microbiology* 25:460-462, 1987.
  11. Poirier P, Auger P, Joly J, Steben M. Interest of biotyping *Candida albicans* in chronic vulvovaginitis. *Mycoses* 33:24-28, 1990.
  12. Provost F, Polonelli L, Conti S, Fiscaro P, Gerloni M, Boiron P. Use of yeast *killer* system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. *Journal Clinical Microbiology* 33:8-10, 1995.
  13. Van der Walt JP, Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. *In: Kreger-Van Rij NJW (ed) The yeasts: a taxonomic study.* Amsterdam, Elsevier, p. 45-104, 1984.
  14. Zaror L, Gallardo A, Valdebenito M, Fischman O. Tipification de *Candida albicans* por los metodos del resistotipo y de las toxinas *killer*. *In: Resumos do V Congresso Chileno de Tecnologia Médica, Valdivia* p.91, 1990.