HENRI DONNARUMMA LEVY BENTUBO

**LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon*: ASPECTOS
ECOLÓGICOS, CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL, FATORES
ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS**

**SÃO PAULO
2008**

HENRI DONNARUMMA LEVY BENTUBO

**LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon*: ASPECTOS
ECOLÓGICOS, CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL, FATORES
ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).**

**SÃO PAULO
2008**

HENRI DONNARUMMA LEVY BENTUBO

**LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon*: ASPECTOS
ECOLÓGICOS, CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL, FATORES
ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas.**

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Walderez Gambale

**SÃO PAULO
2008**

Esse trabalho é dedicado
a todos àqueles que dedicaram, a mim,
os melhores anos de suas vidas,
e me proporcionaram, assim, os melhores anos da minha.

Edson Levy Bentubo
Teresa Aparecida Donnarumma Bentubo
Carolina Fantagussi Bottoni (*in memoriam*)
Alzira Bottoni
Fernanda Evarini

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Walderez Gambale do Laboratório de Micologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), pela concessão e honra da orientação.

À Profa. Dra. Olga Fischman Gompertz do Laboratório de Diagnóstico de Infecções Fúngicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), idealizadora do projeto e incentivadora.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Peleschi Taborda do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), por todos os momentos de compreensão e inestimável colaboração.

À Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera do Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), pelo estímulo ao aprimoramento técnico-profissional e colaboração.

À Profa. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem Melhem e Profa. Dra. Maria Walderez Szeszs, do Laboratório de Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, pela competência, colaboração e gentileza, com as quais nos recebeu.

Ao Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo do Laboratório Sorodiagnóstico em Micologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pela colaboração e excelentes sugestões.

À Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula do Laboratório de Micologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), pela simpatia e colaboração.

À Profa. Dra. Selene Dall'Acqua Coutinho do Laboratório de Biologia Molecular e celular da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Paulista (FMV/UNIP), pela disponibilidade, inestimáveis conselhos e colaboração.

À Profa. Ms. Sônia Khouri Crosoriot da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), pela amizade e colaboração.

À Profa. Dra. Márcia Pinto, Pós-doutoranda do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela compreensão, disponibilidade e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Flávia Miranda, Coordenadora do Grupo de Pesquisa Tamanduá Brasil da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, pela iniciativa e reconhecimento da pesquisa científica como recurso aplicado à sanidade e conservação da fauna silvestre brasileira.

À Profa. Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues, pelo apoio e compreensão dedicados a nós durante o período de desenvolvimento desse trabalho.

À Vivian Russo pela amizade e companheirismo em todos os momentos dessa importante trajetória.

À Ariane Mantovani, aluna dedicada, pessoa esclarecida e profissional competente, cuja colaboração inestimável ajudou a tornar muitos objetivos, realidade.

À médica veterinária Daniela Midori Satake, estimada amiga e colega de profissão.

À Sheila Cristina Nardelli, Doutoranda do Laboratório de Parasitologia da Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela compreensão e disponibilidade na orientação de manejo do microscópio de fluorescência.

À Gislaíne Martins, Doutoranda do Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade, apoio e amizade durante a realização dos testes moleculares.

À Alice, Naíde e Aninha da Secretaria de Pós-Graduação e Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), pela disposição e atenção durante o desenvolvimento do curso de Pós-Graduação.

À Márcia Martins da Secretaria da Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pelos valiosos conselhos e amizade.

Ao senhor Américo e dona Maria da sala de lavagem e esterilização da Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal de São Paulo, pela cordialidade e atenção com a qual tem nos atendido.

À todos os amigos que ao longo desse percurso caminharam comigo, em especial à Clarice Sabadin (UNIFESP), Ellen Gravi (UNIFESP), Agenor Messias Jr (UNIFESP), Mariela (USP), Claudiana (USP) e Bianca (USP).

Eu aprendi

Que a melhor sala de aula do mundo
Está aos pés de uma pessoa mais velha;

Eu aprendi

Que ser gentil é mais importante do que estar certo;

Eu aprendi

Que eu sempre posso fazer uma prece por alguém
Quando não tenho a força para ajudá-lo de alguma outra forma;

Eu aprendi

Que não importa quanta seriedade a vida exija de você.
Cada um de nós precisa de um amigo brincalhão
Para se divertir junto;

Eu aprendi

Que algumas vezes tudo o que precisamos
É de uma mão para segurar
E um coração para nos entender;

Eu aprendi

Que dinheiro não compra classe;

Eu aprendi

Que são os pequenos acontecimentos diários
Que tornam a vida espetacular;

Eu aprendi

Que debaixo da "casca grossa"
Existe uma pessoa que
Deseja ser apreciada, compreendida e amada;

Eu aprendi

Que Deus não fez tudo num só dia
O que me faz pensar que eu possa?

Eu aprendi

Que quando você planeja se nivelar com alguém,
Apenas esta permitindo que essa pessoa
Continue a magoar você;

Eu aprendi

Que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa

É me cercar de gente mais inteligente do que eu;

Eu aprendi
Que cada pessoa que a gente conhece
Deve ser saudada com um sorriso;

Eu aprendi
Que a vida é dura,
Mas eu sou mais ainda;

Eu aprendi
Que quando o ancoradouro se torna amargo
É porque a felicidade vai aportar em outro lugar;

Eu aprendi
Que devemos sempre ter palavras doces e gentis
Pois amanhã talvez tenhamos que engoli-las;

Eu aprendi
Que um sorriso
É a maneira mais barata de melhorar sua aparência;

Eu aprendi
Que não posso escolher como me sinto,
Mas posso escolher o que fazer a respeito;

Eu aprendi
Que quanto menos tempo tenho,
Mais coisas consigo fazer.

Eu aprendi
Que todos querem viver no topo da montanha,
Mas toda felicidade e crescimento
Ocorre quando você está escalando-a;

Ao refletir sobre tudo isso,
Aprendi que tenho muito a aprender.

E que se alguém pensa saber tudo,
É porque não aprendeu como convém saber!

Trechos do poema “I have learned” de William Shakespeare

RESUMO

BENTUBO, H.D.L. **Leveduras do gênero *Trichosporon*: aspectos ecológicos, caracterização laboratorial, fatores associados à virulência e suscetibilidade a antifúngicos**. 2008. 147 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Trichosporon spp. são patógenos oportunistas emergentes que causam alta mortalidade entre pacientes imunocomprometidos. A presente investigação teve como objetivos avaliar aspectos ecológicos relacionados à colonização humana e animal; testar 28 amostras de *Trichosporon* através de métodos de caracterização laboratorial clássica, detectar a atividade enzimática extracelular e avaliar a suscetibilidade desses isolados contra os antifúngicos. A expressão de melanina e glucuronoxylomanana (GXM) em parede celular foi estudada em *T. asahii*. *Trichosporon inkin* e *T. asahii* foram isolados da região perigenital de duas mulheres e dois tamanduás, respectivamente. Microbiologicamente, as amostras investigadas (28) apresentaram características morfológicas e fisiológicas compatíveis com as descritas na literatura. Pouca especificidade na identificação de *Trichosporon* spp. foi verificada em CHROMagar Candida® e API ID 32C®. O estudo da atividade de exoenzimas demonstra a relevância na produção de lipase. Não foi possível detectar a expressão de melanina em *T. asahii*. No entanto, GXM foi expressa por amostra-padrão e isolado clínico da mesma espécie. Embora os pontos de corte não estejam, ainda, bem estabelecidos para *Trichosporon* spp., os testes sugerem valores elevados de concentração inibitória mínima (CIM) para anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Voriconazol demonstrou maior eficácia contra *Trichosporon* spp. A maior parte das amostras apresentou resistência a Caspofungina.

Palavras-chave: 1. Leveduras 2. *Trichosporon* 3. Ecologia dos microrganismos 4. Diagnóstico laboratorial 5. Virulência 6. Antifúngicos.

ABSTRACT

BENTUBO, H.D.L. **Yeasts of the genus *Trichosporon*: ecological aspects, laboratorial characterization, virulence factors and antifungal susceptibility**. 2008. 147 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Trichosporon spp. are emergent opportunistic pathogens that cause high mortality among immunocompromised patients. The aim of the study was to evaluate ecological aspects related to human and animal colonization; to test 28 samples of *Trichosporon* spp on classic laboratorial characterization, detection of the extracellular enzymatic activity and antifungal susceptibility (E-test®). Melanin and glucuronoxylomanan (GXM) wall expression was studied in *T. asahii*. *Trichosporon inkin* and *T. asahii* were isolated from perigenital area of two women and from the haircoat of two anteaters, respectively. Microbiologically, the samples studied (28) have presented morphological and physiological characteristics according to descriptions of the literature. Few specificity on identification of *Trichosporon* spp. was verified at CHROMagar Candida® and API ID 32C® commercial tests. The extracellular enzymatic activity showed the relevance of lipase production. The melanin wall expression was not verified in *T. asahii*. On the other hand, GXM was expressed by the control and the clinical sample, both of the same specie. Though the sensibility break points were still not established for *Trichosporon* spp., the tests indicate high values of minimal inhibitory concentration (MIC) for amphotericin B, fluconazole, itraconazole and cetoconazole. Voriconazole showed the best results against *Trichosporon* spp. The most part of the samples was resistant to Caspofungin.

Key words: 1. Yeasts 2. *Trichosporon* 3. Microbes ecology 4. Laboratorial diagnostic 5. Virulence 6. Antifungal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Identificação esquemática de <i>Trichosporon</i> spp. segundo De Hoog et al., 2000.....	43
Figura 1. Leveduras isoladas da pele da região genital dos 83 pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo, UNIFESP-EPM (junho/06 a abril/07).....	51
Figura 2. Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>) (A) e tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>) (B), provenientes do Parque Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba, SP).....	53
Figura 3. Colheita de amostra de pelame em tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>) (A) e tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>) (B) provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (Zoo-SP) através da técnica do carpete (Mariat; Adam-Campos, 1967).....	54
Figura 4. Teste de produção de urease em meio de ágar uréia de Christensen, A1: controle positivo (<i>C. neoformans</i>), A2: controle negativo (<i>C. albicans</i>) e A3: amostra testada (<i>Trichosporon</i> sp). Em B: teste de fermentação de carboidratos, B1: controle negativo (sem inóculo), B2: amostra (<i>Trichosporon</i> sp) e B3: controle positivo (seta indica fermentação positiva de <i>C. albicans</i>).....	56
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto da extração de DNA genômico bruto de 42 isolados de <i>Trichosporon</i> spp. Marcador Lambda hind III VJR [®] (M).....	59
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto do PCR de 38 isolados leveduriformes de importância médica presuntivamente identificados como <i>Trichosporon</i> spp. Visualização de 19 bandas de aproximadamente 170pb, compatível com gênero <i>Trichosporon</i> . Nota-se formação de bandas com intensidade fraca, pouco visíveis em imagem normal. Marcador Lambda hind III VJR [®] (M). Controles positivos da reação: <i>T. inkin</i> (CBS 5585) (2) e <i>T. ovoides</i> (CBS 7556) (4). Controles negativos: água destilada, deionizada e esterilizada (Br).....	60
Figura 7: Imagem invertida da eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto do PCR de 38 isolados leveduriformes de importância médica presuntivamente identificados como <i>Trichosporon</i> spp. Confirmação do total de 24 bandas de aproximadamente 170pb, compatíveis com gênero <i>Trichosporon</i> . Nota-se formação de bandas com intensidade fraca, pouco visíveis em imagem normal. Marcador Lambda hind III VJR [®] (M). Controles positivos da reação: <i>T. inkin</i> (CBS 5585) (2) e <i>T. ovoides</i> (CBS 7556) (4). Controles negativos: água destilada, deionizada e esterilizada (Br).....	61

- Figura 8:** Comparação das características macromorfológicas apresentadas por cultivos de *T. asahii* CBS 2479 com três (1), sete (2) e quinze (3) dias de incubação a 25°C (primeira linha) e três (4), sete (5) e quinze (6) dias a 37°C (segunda linha)..... 69
- Figura 9:** Comparação das características macromorfológicas apresentadas por cultivos de *T. inkin* CBS 5585 com três (1), sete (2) e quinze (3) dias de incubação a 25°C (primeira linha) e três (4), sete (5) e quinze (6) dias a 37°C (segunda linha)..... 69
- Figura 10:** Comparação das características macromorfológicas apresentadas por cultivos de *T. inkin* (EPM 129CC/06) com três (1), sete (2) e quinze (3) dias de incubação a 25°C (primeira linha) e três (4), sete (5) e quinze (6) dias a 37°C (segunda linha)..... 70
- Figura 11:** Comparação das características macromorfológicas apresentadas por cultivos de *T. ovoides* CBS 7556 com três (1), sete (2) e quinze (3) dias de incubação a 25°C (primeira linha) e três (4), sete (5) e quinze (6) dias a 37°C (segunda linha)..... 70
- Figura 12.** Características micromorfológicas de *Trichosporon* spp. em ágar Fubá-Tween 80. Blastocónidios, hifa, pseudo-hifas (A) e artroconídios em forma de barril (B) em isolado de *T. asahii* (400x); artroconídio cilíndricos e alongados (C) e pseudo-hifas com conídios laterais (D) compatíveis com *T. inkin* (1000x). Hifas com conídios laterais clavados (E) em *T. mucoides* (1000x); e artroconídios cilíndricos mais curtos (F) em *T. ovoides* (1000x)..... 74
- Figura 13.** Comportamento cromogênico de amostras de *Trichosporon* spp. em meio de CHROMagar Candida®. Nota-se variação no padrão de coloração tanto da colônia quanto do pigmento difuso no meio de cultura entre dois isolados de *T. asahii* CBS 2479 (A) e amostra clínica previamente identificada como *T. asahii* (B). Zonas marginais não pigmentadas em dois isolados de *Trichosporon* sp (C e D). Colônia violácea com pigmento esverdeado difuso em *T. inkin* CBS 5585 (E), e centro verde e nuances lilás em *T. ovoides* (CBS 7556) (F)..... 82
- Figura 14.** Amostras de *Trichosporon* spp. testadas para produção proteinase. Amostra de *C. albicans* (ICB 12A) expressando atividade positiva (A), *T. asahii* (ICB439/98) não produtora (B) e amostra de *T. inkin* (CBS 5585) com atividade de proteinase detectada (C)..... 84
- Figura 15.** Produção de enzimas extracelulares por *Trichosporon* spp. Verifica-se halo de degradação por fosfolipase (A); amostras negativa (B) e positiva (C) para lipase; ausência de halo de degradação por DNase (D) e outras duas amostras produtoras de DNase (E e F)..... 86
- Figura 16.** Expressão de melanina em parede celular. Comparação entre a parede celular de amostra positiva de *Cryptococcus neoformans* (ICB 162C) (A) e amostra negativa de *Trichosporon asahii* (ICB 86/03) (B). Microscopia eletrônica de transmissão, 20.000x..... 96

Figura 17. Detecção da expressão de antígeno polissacarídico glucuronoxilomana (GXM) em parede celular de <i>Trichosporon asahii</i> em campo claro (linha superior) e em campo escuro (linha inferior). A - <i>Candida albicans</i> ICB 12A (conrole negativo); B - <i>Cryptococcus neoformans</i> ICB 162C (controle positivo); C - <i>Trichosporon asahii</i> CBS 2479) (amostra-padrão) e D - <i>Trichosporon asahii</i> (ICB 86/03) (amostra testada).....	97
Figura 18. Testes de suscetibilidade a antifúngicos (E-test®) para amostras de <i>Trichosporon</i> spp. A – Amostra de <i>T. asahii</i> X anfotericina B (CIM = 0,125µg/mL); B – <i>T. inkin</i> X fluconazol (CIM = 3µg/mL); C – <i>T. asahii</i> X itraconazol (CIM = 0,032µg/mL); D – <i>T. asahii</i> X cetoconazol (CIM = 0,38µg/mL); E – <i>T. inkin</i> X voriconazol (CIM = 3µg/mL); e F – <i>T. mucoides</i> X caspofungina (Resistente).....	99
Figura 19. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de anfotericina B para diferentes espécies de <i>Tichosporon</i>	100
Figura 20. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de fluconazol para <i>T. asahii</i> , <i>T. inkin</i> e <i>T. ovoides</i>	100
Figura 21. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de itraconazol para <i>T. asahii</i> , <i>T. inkin</i> e <i>T. ovoides</i>	101
Figura 22. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de cetoconazol para <i>T. asahii</i> , <i>T. inkin</i> e <i>T. ovoides</i>	101
Figura 23. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de voriconazol para <i>T. asahii</i> , <i>T. inkin</i> e <i>T. ovoides</i>	102
Figura 24. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de caspofungina para <i>T. mucoides</i>	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos isolados leveduriformes incluídos na primeira fase de testes (triagem) da presente investigação. Amostragem compreende 38 leveduras suspeitas de <i>Trichosporon</i> e quatro amostras-padrão.....	39
Tabela 2. Análise da distribuição por faixa etária, dos 83 pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo, UNIFESP-EPM (junho/06 a abril/07).....	50
Tabela 3. Espécies de leveduras isoladas na pele da região genital de 83 pacientes atendidos pelo ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo, UNIFESP-EPM (junho/06 a abril/07).....	52
Tabela 4: Isolamento de leveduras da microbiota do pelame de 27 tamanduás sadios provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZ-SP) e Parque Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba-SP).....	55
Tabela 5: Determinação da quantidade e grau de pureza do extraído das amostras de <i>Trichosporon</i> sp. em aparelho Nanodrop®	58
Tabela 6: Relação dos isolados leveduriformes selecionados para caracterização microbiológica, segundo testes de triagem para identificação do gênero <i>Trichosporon</i>	62
Tabela 7. Características macromorfológicas de espécies de <i>Trichosporon</i> estudadas através de cultivo em placa de petri contendo meio de ágar Sabouraud dextrose e incubadas sob diferentes temperaturas, durante 15 dias.....	65
Tabela 8. Medidas do diâmetro (milímetros) das colônias de <i>Trichosporon</i> spp. durante o período de incubação em diferentes temperaturas em meio de ágar Sabouraud dextrose.....	67
Tabela 9. Características micromorfológicas de espécies de <i>Trichosporon</i> estudadas através de cultivo em lâmina com meio de ágar fubá acrescido de Tween 80 e incubadas a temperatura ambiente durante 24 horas.....	72
Tabela 10. Medidas das colônias de <i>Trichosporon</i> spp. submetidas a crescimento em ASD, ASD + 0,1% de ciclo-heximida e ASD + 0,01% de ciclo-heximida, incubada sob diferentes temperaturas durante 72 horas.....	75
Tabela 11. Proporção de crescimento (%) das colônias de <i>Trichosporon</i> spp. submetidas a crescimento em ASD, ASD + 0,1% de ciclo-heximida e ASD + 0,01% de ciclo-heximida, incubada sob diferentes temperaturas durante 72 horas.....	77

Tabela 12. Testes bioquímicos aplicados à identificação de amostras de <i>Trichosporon</i> (De Hoog et al., 2000).....	79
Tabela 13. Resultados obtidos na identificação das amostras de <i>Trichosporon</i> spp. através da aplicação de kit semi-automatizado ID 32 C (Biomerieux®, Marcy-l'Etoile, França). Leitura em 72 horas.....	83
Tabela 14. Atividade enzimática de proteinase em 24 amostras de <i>Trichosporon</i> spp. e quatro amostras-padrão observadas em leituras de 24h, 48h, 72h, cinco, sete e 15 dias; código de atividade enzimática estabelecido segundo Ruchel et al, 1982.....	87
Tabela 15. Atividade enzimática de fosfolipase em 24 amostras de <i>Trichosporon</i> spp. e quatro amostras-padrão observadas em leituras de 24h, 48h, 72h, cinco, sete e 15 dias; código de atividade enzimática estabelecido segundo Price et al, 1982.....	89
Tabela 16. Atividade enzimática de lipase em 24 amostras de <i>Trichosporon</i> spp. e quatro amostras-padrão observadas em leituras de 24h, 48h, 72h, cinco, sete e 15 dias; código de atividade enzimática estabelecido segundo Mushin et al, 1997.....	91
Tabela 17. Atividade enzimática de DNase em 24 amostras de <i>Trichosporon</i> spp. e quatro amostras-padrão observadas em leituras de 24h, 48h, 72h, cinco, sete e 15 dias; código de atividade enzimática estabelecido segundo Lopez-Martinez et al, 1994.....	93
Tabela 18. Atividade da enzima lacase segundo os valores de absorbância apresentados pelos cultivos mantidos na presença e ausência de L-DOPA.....	95
Tabela 19. Valores de MIC (Concentração Inibitória Mínima) em microgramas por mililitro em 28 amostras de <i>Trichosporon</i> estudadas pela técnica da fita de difusão E-test®	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Leveduras.....	23
1.2 Importância das leveduras.....	23
1.3 Patógenos emergentes.....	24
1.4 O gênero <i>Trichosporon</i>.....	24
1.5 Colonização.....	26
1.6 Infecções superficiais.....	27
1.7 Infecções invasivas.....	28
1.8 Técnicas moleculares.....	30
1.9 Fatores associados à virulência.....	31
1.10 Suscetibilidade a antifúngicos.....	33
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Aspectos ecológicos de <i>Trichosporon</i> spp.....	37
4.1.1 Pesquisa em humanos e animais.....	37
4.2 Amostras submetidas a triagem.....	38
4.3 Caracterização laboratorial do gênero <i>Trichosporon</i>.....	39
4.3.1 Testes bioquímicos para a triagem de leveduras do gênero <i>Trichosporon</i>	39
4.3.2 Caracterização molecular de leveduras do gênero <i>Trichosporon</i>	40
4.3.2.1 Extração do DNA genômico.....	40
4.3.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	40
4.4 Amostras selecionadas para a investigação microbiológica.....	41
4.5 Caracterização das espécies de <i>Trichosporon</i>.....	41
4.5.1 Estudo morfológico aplicado à caracterização de espécies de <i>Trichosporon</i>	41
4.5.1.1 Macromorfologia e crescimento em diferentes temperaturas.....	41
4.5.1.2 Micromorfologia.....	42
4.5.2 Testes bioquímicos para caracterização de espécies de <i>Trichosporon</i>	42
4.5.2.1 Assimilação de fontes de carbono.....	42
4.5.2.2 Crescimento em meio suplementado com ciclo-heximida.....	42
4.6 Comportamento cromogênico do gênero <i>Trichosporon</i> em CHROMagar Candida®.....	43
4.7 Identificação semi-automatizada (ID 32 C) (Biomerieux®).....	43
4.8 Pesquisa dos fatores associados à virulência.....	44
4.8.1 Detecção da produção de enzimas extracelulares.....	44
4.8.1.1 Atividade de proteinases.....	44
4.8.1.2 Atividade de fosfolipases.....	45
4.8.1.3 Atividade de lipases.....	45
4.8.1.4 Atividade de DNAses.....	45
4.8.2 Detecção de melanina em parede celular de <i>Trichosporon asahii</i>	46
4.8.2.1 Amostras testadas e metodologia.....	46
4.8.2.2 Cultivo dos isolados.....	46
4.8.2.3 Indução da produção de melanina por <i>Trichosporon asahii</i>	46

4.8.2.4 Análise colorimétrica da atividade da lacase.....	46
4.8.2.5 Detecção da produção de melanina.....	47
4.8.2.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	47
4.8.3 Detecção de antígeno glucuronoxilomanana (GXM).....	48
4.8.3.1 Amostras testadas.....	48
4.8.3.2 Imunofluorescência direta.....	48
4.9 Teste de sensibilidade a antifúngicos.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Aspectos ecológicos de <i>Trichosporon</i> spp.....	50
5.1.1 Pesquisa e isolamento de amostras de <i>Trichosporon</i> spp. em seres humanos.....	50
5.1.2 Pesquisa e isolamento de amostras de <i>Trichosporon</i> spp. em animais.....	52
5.1.2.1 Leveduras em microbiota de cães saudáveis.....	52
5.1.2.2 Leveduras em microbiota de tamanduás saudáveis.....	53
5.2 Caracterização laboratorial do gênero <i>Trichosporon</i>.....	56
5.2.1 Testes bioquímicos empregados na caracterização do gênero <i>Trichosporon</i>	56
5.2.2 Caracterização molecular de leveduras do gênero <i>Trichosporon</i>	57
5.2.2.1 Extração do DNA genômico.....	57
5.2.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	58
5.2.3 Amostragem selecionada.....	62
5.3 Caracterização das espécies de <i>Trichosporon</i>.....	63
5.3.1 Estudo morfológico empregado na caracterização das espécies de <i>Trichosporon</i> ...	63
5.3.1.1 Macromorfologia e crescimento sob diferentes temperaturas.....	63
5.3.1.2 Micromorfologia.....	71
5.3.2 Testes bioquímicos empregados na caracterização das espécies de <i>Trichosporon</i> ..	71
5.3.2.1 Assimilação de fontes de carbono.....	71
5.3.2.2 Sensibilidade a ciclo-heximida.....	71
5.4 Comportamento cromogênico do gênero <i>Trichosporon</i> em CHROMagar	
<i>Candida</i>®	81
5.5 Identificação semi-automatizada (ID 32 C).....	81
5.6 Pesquisa dos fatores associados à virulência.....	84
5.6.1 Detecção da produção de enzimas extracelulares.....	84
5.6.1.1 Atividade de proteinases.....	84
5.6.1.2 Atividade de fosfolipases.....	85
5.6.1.3 Atividade de lipases.....	85
5.6.1.4 Atividade de DNases.....	86
5.6.2 Detecção de melanina.....	95
5.6.2.1 Melanização das células de <i>T. asahii</i>	95
5.6.2.2 Atividade da lacase.....	95
5.6.3 Detecção de GXM em parede celular de <i>Trichosporon asahii</i>	95
5.6.3.1 Imunofluorescência direta.....	95
5.7 Teste de sensibilidade a antifúngicos (E-test®).....	96

6 DISCUSSÃO.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
ANEXOS.....	135

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leveduras

Fungos são microrganismos eucarióticos, isto é, possuem núcleo envolto por carioteca e sua parede é constituída por polissacarídeos (glucanas, mananas e quitina) e glicoproteínas. Podem ser pluricelulares (bolors) ou unicelulares (leveduras), ambos desprovidos de clorofila e celulose, o que os diferencia das plantas (COLLIER et al., 1999).

As leveduras possuem células esféricas ou ovaladas, com um só núcleo, que desempenham autonomamente suas funções vegetativas e reprodutivas. Macroscopicamente, as colônias leveduriformes apresentam aspecto cremoso e coloração, predominantemente, branca podendo ser vermelhas ou pretas (LACAZ et al., 2002).

Seu ciclo reprodutivo ocorre por mecanismo de cissiparidade, também denominado, brotamento. Nesse processo, uma célula “mãe” (gêmula) origina uma célula “filha” (blastoconídio). Os brotamentos podem tanto se desligar da sua origem (célula mãe) e constituírem novas colônias; como permanecerem ligados através de sucessivos brotos, assumindo um arranjo em cadeia (pseudo-hifa), que se diferencia da hifa-verdadeira, por apresentar constrição nos septos (KWON-CHONG; BENNETT, 1992).

Outro elemento de propagação das leveduras é o artroconídio, unidade ovalada e/ou retangular, proveniente da fragmentação de segmentos das hifas-verdadeiras. Clamidoconídios são células, geralmente, arredondadas, de volume aumentado e paredes espessas, que se forma mediante condições adversas, funcionando como estruturas de resistência do fungo. Sua localização pode ser terminal ou intercalar na hifa (LACAZ et al., 2002).

1.2 Importância das leveduras

As leveduras constituem um grupo de fungos unicelulares que pode ser encontrado em saprofitismo, ou seja, no meio ambiente. São seres heterotróficos, que necessitam de matéria orgânica elaborada para a sua nutrição. A absorção dos nutrientes ocorre pela ação de enzimas que hidrolisam as macromoléculas e permitem sua assimilação através dos mecanismos de

transporte ativo e passivo. Por isso, os fungos estão entre os principais biodegradadores de matéria orgânica do nosso planeta (LACAZ et al., 2002).

No entanto, sua habilidade em se multiplicar em diferentes temperaturas e valores de pH, permitiu que esses microrganismos colonizassem superfícies inanimadas, artrópodes, peixes e mamíferos. Fatores predisponentes do hospedeiro as tornam capazes de invadir os tecidos colonizados, causando doenças superficiais e invasivas graves (NUCCI et al., 1995).

1.3 Patógenos emergentes

A emergência de novos patógenos fúngicos, mas de grande importância médica, tem contribuído para o aumento da morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Infecções fúngicas invasivas são causa significativa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunodeprimidos (WARNOCK, 1998; FISHER; STERBECK, 2005). Pacientes com câncer, diabetes, transplantados de órgãos, etc, constituem uma nova população de doentes, dos fins do século XX e início do século XXI, que apresentam maior sobrevida devido a técnicas cirúrgicas mais agressivas, regimes terapêuticos com emprego de novos fármacos e diagnósticos mais aprimorados. Essa população da “nova era”, ao mesmo tempo, que atinge maior longevidade, também está mais sujeita à infecções oportunistas por patógenos emergentes. Entre esses agentes microbianos devem ser destacadas espécies do gênero *Trichosporon*, identificadas como importantes causas de infecção invasiva (GIUSIANO et al., 2004; SILVA; CANDIDO, 2005; GIRMENIA et al., 2005).

1.4 O gênero *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* compreende inúmeras espécies que habitam diferentes nichos ecológicos na natureza. Sugita et al. (2000) consideram *T. asahii* como um microrganismo comum na natureza. *Trichosporon* spp. podem ser encontrados em água, solo e superfície corpórea de humanos e animais (KAPLAN 1959; HERBRECHT et al., 1993; MARTINS-DINIZ et al., 2005). De Hoog (1996) estabeleceu uma classificação para o risco de infecções fúngicas para seres humanos e animais. *Trichosporon asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* são consideradas espécies que essencialmente ocupam nichos ecológicos não-

vertebrados, mas que possuem habilidade relativamente pronunciada de sobreviver em tecidos de organismos vertebrados, onde são capazes de desenvolver micoses oportunistas superficiais e profundas.

Além das infecções superficiais (piedra branca, dermatites e onicomicoses) às quais o gênero *Trichosporon* pode ser relacionado, quadros de tricosporonose disseminada também têm sido observados. Esses casos de infecção invasiva são mais comuns em pacientes imunossuprimidos, como portadores da síndrome da imunodeficiência (COPPOLA et al., 1993); transplantados (MORETTI-BRANCHINI et al., 2001) e aqueles com doenças hematológicas malignas (MEYER et al., 2002).

As espécies de *Trichosporon* isoladas de amostras clínicas estão associadas ao tipo de infecção: *T. inkin* e *T. ovoides*, agentes comuns da piedra branca da região crural e couro cabeludo, respectivamente; *T. asteroides* e *T. cutaneum* associados com lesões cutâneas, enquanto *T. asahii* e *T. mucoides* são mais freqüentemente envolvidos em infecções invasivas, ressaltando-se a predominância de *T. asahii* (SUGITA et al., 1995).

Através de estudos recentes sobre a seqüência do RNAr subunidade 26-S e reassociações de DNA, pesquisadores do Instituto Pasteur (Paris) reconheceram 19 taxos distintos para o gênero *Trichosporon* sendo 13 deles considerados predominantemente sapróbios (*T. aquatile*, *T. bassicae*, *T. cerebriforme*, *T. dulcitum*, *T. faecale*, *T. gracile*, *T. jiroveci*, *T. laibachi*, *T. loubieri*, *T. moniliforme*, *T. montevideense*, *T. pullulans* e *T. sporotricoides*) e seis espécies mais comuns em doença humana: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* (GUÉHO et al., 1992; GUÉHO et al., 1994).

O gênero *Trichosporon* é caracterizado pela formação de artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas (COX; PERFECT, 1999). Morfologicamente, as espécies patogênicas são muito semelhantes e podem ser confundidas facilmente (YAMAMOTO et al., 1997), apresentando, às vezes, morfologia característica capaz de diferencia-los.

Em ágar Sabouraud dextrose colônias de *T. asahii* apresentam-se secas, com fissuras profundas, zona marginal e centro branco com aspecto farináceo. Brotamentos e conídios laterais estão ausentes (COX; PERFECT, 1999). Colônias de *T. cutaneum* revelam-se úmidas e brilhantes, amplas, fissuradas e com zona marginal sem cobertura de aspecto farináceo. Os artroconídios são cilíndricos a elipsóides, neste caso, os conídios laterais estão presentes. Conforme se sucedem os repiques, predominam as hifas (GUÉHO et al., 1992).

Colônias de *T. mucoides* são úmidas e brilhantes e apresentam elevações irregulares com fissuras radiais largas. Conidióforos laterais e terminais curtos com conídios clavados são comumente observados. Coloração branca, aspecto farinhoso, pregas irregulares ao centro e zona marginal plana são características do *T. ovoides*. Seus artroconídios são cilíndricos e apressórios estão presentes (GUÉHO et al., 1992). As colônias de *T. inkin* são restritas, de aspecto cerebriforme, sem zona marginal. Frequentemente o meio de cultura se apresenta partido. Brotamentos e conídios laterais, ausentes. Também apresenta células apressórias e os artroconídios são longos e cilíndricos (GUÉHO et al., 1992).

Muitos isolados de infecções disseminadas têm demonstrado morfotipos distintos em ágar Sabouraud dextrose, como, aparência rugosa ou pulverulenta e coloração acinzentada (WALSH et al., 1986). Alguns micologistas têm interpretado este fato como a representação de espécies distintas dentro do gênero *Trichosporon*, as quais estão associadas à infecção invasiva (COX; PERFECT, 1999).

1.5 Colonização

A microbiota fúngica que compõe a superfície corpórea dos seres vivos é constitutivamente dinâmica, ou seja, sofre periodicamente, mudanças qualitativas e/ou quantitativas. Essas mudanças decorrem, em grande parte, de fatores ambientais, como, localização geográfica, sanidade e condições climáticas (temperatura e o tempo de exposição à luz ultravioleta) (ARAÚJO et al., 2003).

Dentre os fungos que constituem a microbiota superficial do homem, as leveduras apresentam destacada importância, principalmente em indivíduos neutropênicos (NUCCI et al., 1995). Os fungos leveduriformes mais comumente isolados são: *Candida* spp. (CROCCO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006), *Rhodotorula* spp. (GARCIA-MARTOS et al., 2004; LUNARDI et al., 2006; RIEDEL et al., 2007), *Malassezia* spp. (SCHOLOTTFELDT et al., 2002; TARAZOIE et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006) e *Trichosporon* spp. (HERBRECHT et al., 1993).

As espécies de *Trichosporon* têm sido isoladas da natureza, principalmente do solo e da água (PAULA et al., 1983; MARTINS et al., 1989). *Trichosporon asahii*, espécie muito

importante nas infecções invasivas, é considerado agente comum do ambiente (SUGITA et al., 2000). *Trichosporon* spp. têm sido também identificados em catéteres, sondas tipo “foley”, gastroscópios e anestésico tópico (STONE; MANASSE, 1989; SINGH et al., 1989; HERBRECHT et al., 1993).

O fungo já foi isolado de roupas íntimas (ELLNER et al., 1990), fortalecendo a idéia de que o microclima estabelecido, principalmente na região crural, favoreça a colonização humana (COX; PERFECT, 1999). Acredita-se que o fungo não seja transmitido homem a homem, revelando assim, a importância da interação entre o estado de portador e fatores predisponentes ao estabelecimento da doença.

1.6 Infecções superficiais

Piedra branca é infecção, muitas vezes assintomática, determinada pelo crescimento de *Trichosporon* spp. na haste do pêlo, caracterizada por nódulos de coloração branca, cinza pálida ou amarelada, compostos por elementos fúngicos compactados facilmente destacados do pêlo. Os folículos não são invadidos, mas os pêlos podem se tornar quebradiços, dependendo do tempo de permanência do fungo (GUÉHO et al., 1992).

A doença foi descrita pela primeira vez como uma infecção fúngica em 1865, por Beigel, quando obteve isolamento do fungo de nódulos dos cabelos de uma peruca. Dois anos depois, Rabenhorst denominou o microrganismo de *Pleurococcus beigelii*, em homenagem a Beigel (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Desde então, o fungo tem recebido denominações variadas por diferentes pesquisadores (COLLIER et al., 1999).

A infecção pode atingir os cabelos, pêlos axilares ou da região crural, barba, bigode, sobrancelhas e cílios. Piedra branca já foi observada no pelame de outros mamíferos, como cavalos e primatas selvagens (KAPLAN, 1959). Fatores socioeconômicos, higiênicos, sexo e hábitos sexuais são determinantes na prevalência da piedra branca (STENDERUP et al., 1986; ELLNER et al., 1993; TRÉRIZOL-FERLY et al., 1994).

A infecção cutânea não é frequentemente documentada na literatura. No entanto, intertrigo, é um sinal muito observado no sul da Índia, onde as regiões genitocrural e perianal são acometidas, sendo *T. inkin* a espécie mais relacionada a esse tipo de infecção (HERBRECHT et

al., 1993). Além da piedra branca, onicomicoses e otomicoses também já foram relatadas na literatura (HERBRECHT et al., 1993).

O tratamento para o tipo superficial de infecção é baseado na adoção de medidas higiênicas, como tricotomia da região e aplicação tópica de solução cremosa de clotrimazol ou ungüento à base de mercúrio amoniacal 5% (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Entretanto, recidivas são frequentemente observadas (WALZMAN; LEEMING, 1989).

1.7 Infecções invasivas

O primeiro caso de infecção sistêmica, descrito na literatura médica, data de 1970 e relata o acometimento de um paciente do sexo feminino de 39 anos de idade com histórico de metástase pulmonar. Ao exame pós-morte, a cultura de cérebro evidenciou crescimento de *Trichosporon* sp (COLLIER et al., 1999). A partir desta primeira descrição de infecção invasiva, mais de uma centena de novos casos foram descritos na literatura até o início dos anos 90 (HERBRECHT et al., 1993).

Tricosporonose é doença fúngica do tipo invasivo que acomete, principalmente, indivíduos imunocomprometidos. Está relacionada, particularmente, a enfermidades hematológicas malignas, como linfomas e leucemias. Pacientes submetidos a transplantes de órgãos, principalmente de medula óssea, por seu estado de profunda depressão imunológica, estão sujeitos à infecções por *Trichosporon* spp. (WALSH et al., 1986; VASTA et al., 1993; TASHIRO et al., 1995; KREMERY et al., 1999).

Além das enfermidades hematológicas malignas e transplantes de órgãos, outros fatores de risco para estabelecimento da infecção são: Aids, longos períodos de cateterização intravenosa, uso crônico de corticosteróides e cirurgias de válvulas cardíacas (MARTINEZ-LACASA et al., 1991; BARCHIESI et al., 1993; WALSH et al., 1993; SPANIK et al., 1995).

A tricosporonose pode ser localizada ou disseminada; a primeira forma é caracterizada por infecções confinadas a um único órgão ou sistema. As regiões mais, frequentemente, atingidas são as válvulas cardíacas, peritônio, feridas cirúrgicas e sistema nervoso central (SNC) (COX; PERFECT, 1999).

O gênero *Trichosporon* também tem sido identificado como agente antigênico capaz de causar um tipo sazonal de pneumonite por hipersensibilidade no Japão (YOSHIDA et al., 1988).

A inalação de antígenos purificados de cultura foi positiva em muitos pacientes estudados naquele país e a correlação pôde ser estabelecida entre o tipo de antígeno inalado e aquele dos fungos isolados das residências dos pacientes (ANDO et al., 1990). Os autores japoneses reconhecem dois tipos de antígenos, o sorotipo I, que corresponde ao *T. mucoides*; e antígeno II, que corresponde ao *T. asahii*, espécie mais frequentemente relacionada à infecção invasiva (HERBRECHT et al., 1993).

A forma disseminada, mais comum, ocorre geralmente em situações de neutropenia acentuada e é caracterizada por um estado febril inespecífico, que não cede à terapia com antibacterianos ou antifúngicos, usuais. A infecção progride rapidamente, culminando com a falência múltipla dos órgãos. Os pulmões e rins são os órgãos mais comumente envolvidos. Os pacientes com acometimento pulmonar, geralmente apresentam dispnéia e tosse produtiva com escarro escasso e presença de sangue, enquanto hematúria e proteinúria caracterizam as manifestações da falência renal (COX; PERFECT, 1999).

O acometimento cutâneo na forma disseminada se caracteriza pela presença de pápulas eritematosas no tronco e extremidades, que podem com o tempo, formar bolhas com centros necróticos (WALSH et al., 1993; HSIAO et al., 1994).

Alguns pacientes apresentam uma forma disseminada crônica de tricosporonose, que se assemelha muito à candidíase disseminada crônica, e podem se recuperar da neutropenia e responder ao tratamento com antifúngicos. Múltiplas lesões hepato-esplênicas, acompanhadas de febre e elevados níveis séricos de fosfatase alcalina (FA) têm sido relatadas (WALSH et al., 1993).

A tricosporonose se inicia com a colonização das superfícies mucosas e, subseqüentemente, se dissemina por via hematogênica, como resultado do rompimento da integridade das superfícies. Tal rompimento pode ser secundário a danos epiteliais induzidos por quimioterapia ou cateteres intravasculares. Acredita-se que a destruição da microbiota residente pelos antibacterianos aumente o risco de infecção (MARTINEZ-LACASA et al., 1991).

Trichosporon asahii tem sido a espécie mais, freqüentemente, relacionada a casos invasivos de infecção, seguido por *T. mucoides* e *T. inkin* (FLEMING et al., 2002; MADARIAGA et al., 2003). Recentemente, achados clínicos e microbiológicos confirmaram as espécies *T. loubieri* e *T. pulullans* como patógenos humanos e demonstraram a sua capacidade em causar infecções invasivas (MARTY et al., 2003; LESTINI; CHURCH, 2006).

Devido à profunda imunossupressão e debilidade apresentada pelos pacientes com infecção invasiva, torna-se muito difícil obter sucesso no tratamento. Segundo Anaissie et al. (1992), a cura da infecção apenas pôde ser observada naqueles pacientes que não se encontravam em fase neutropênica ou que já haviam se recuperado da mesma no momento do diagnóstico. O melhor antifúngico e o tempo de tratamento para a tricosporonose invasiva não foram ainda bem estabelecidos (COX; PERFECT, 1999).

1.8 Técnicas moleculares

O aumento crescente de infecções oportunistas, geralmente de evolução aguda e fatal, em pacientes imunodeprimidos hospitalizados, resultou no aprimoramento e desenvolvimento de técnicas diagnósticas que apresentassem maior especificidade, sensibilidade e rapidez nos resultados, substituindo ou complementando as técnicas sorológicas ou imunológicas existentes. Técnicas moleculares inicialmente usadas em bacteriologia, foram adaptadas para sua aplicação em micologia médica (DIGBY et al., 2003).

Com o desenvolvimento da eletroforese em campo pulsado (PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) para separação de grandes moléculas de DNA, foi possível obter conhecimentos a respeito dos cromossomos de uma série de espécies fúngicas. Dada a especificidade e reprodutibilidade que PFGE demonstra, tem sido também aplicada a caracterização molecular de fungos patogênicos e em estudos taxonômicos, tanto no âmbito de gênero como de espécie, com base no polimorfismo dos cromossomos desses microrganismos (POLACHECK; LEBENS, 1989; REIS et al., 1998; PIZZIRANI-KLEINER; MUHLEN, 1998).

O método de reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain reaction*) foi desenvolvido e tem sido capaz de detectar ampla variedade de fungos de importância médica em diferentes materiais clínicos (MAKIMURA et al., 1994), sendo muito útil quando usado em associação com métodos tradicionais na detecção precoce da infecção e identificação do agente; ou no monitoramento do progresso, ou seja, resposta do paciente à terapia (NAGAI et al., 1999). Identificação rápida e acurada de espécies do gênero *Trichosporon* através de técnicas moleculares foi conseguida pelo emprego de iniciadores contendo seqüências muito conservadas das regiões ITS-1 e ITS-2 do DNA genômico (NAGAI et al., 1999; LI et al., 2005).

1.9 Fatores associados à virulência

A capacidade de um fungo causar danos ao seu hospedeiro pode estar relacionada a inúmeros fatores. Alguns desses fatores estão diretamente associados com o estado geral de integridade do hospedeiro enquanto outros estão mais comumente relacionados às características fisiológicas e bioquímicas dos próprios agentes microbianos (NAGLIK et al., 2004)

A formação de hifas durante as infecções invasivas, assim como para *Candida albicans*, é associada à virulência do fungo (COLLIER et al., 1999). Estudos histopatológicos tanto aqueles provenientes de infecção experimental como humana, demonstraram que muitas das lesões em tricosporonose são decorrentes da embolia vascular consequente a angioinvasão por estruturas fúngicas, que levam geralmente a infarto multifocal dos órgãos acometidos (NAHASS et al., 1993).

Os fungos possuem amplo repertório enzimático que permite a metabolização de fontes nutricionais primárias existentes no meio ambiente desde quando esses microrganismos ainda desempenhavam apenas papel sapróbio. A evolução proporcionou que esse complexo enzimático contribuisse com os fungos no estabelecimento do parasitismo de hospedeiros, funcionando como importante fator associado à virulência dessas espécies (GÁCSER et al., 2007).

O estudo da atividade enzimática extracelular contribuiu muito para o esclarecimento de muitos aspectos relacionados com a ecologia e patogenicidade dos fungos. Esses aspectos foram muito bem estudados no gênero *Candida*, levedura considerada a mais importante em infecções superficiais e invasivas em seres humanos suscetíveis. No entanto, a pesquisa da atividade de exoenzimas também já foi estudada em *Basidiomycetes* como os do gênero *Malassezia* e *Trichosporon* (COUTINHO; PAULA, 2000; NAGLIK et al., 2004; ICHIKAWA et al., 2004).

Através de estudos moleculares foi possível determinar a estreita relação entre os gêneros *Cryptococcus* e *Trichosporon* (GUÉHO et al., 1993). Estes dois fungos têm antígenos em comum, por isso é possível a ocorrência de reação cruzada durante a realização da prova de antígeno polissacarídico criptocócico em pacientes com tricosporonose (MCMANUS; JONES, 1985; MELCHER et al., 1991).

A glucuronoxilomanana (GXM) é um antígeno de parede desses fungos e tem sido associada à virulência. Isolados de *Trichosporon* spp. de infecções invasivas apresentam alta

produção deste antígeno, possuindo a mesma propriedade imunomodulatória apresentada na criptococose (LYMAN et al., 1995).

Estudos experimentais ilustram a diferença na produção de GXM pelas células fúngicas através da comparação entre as mesmas, antes e após sucessivas passagens em camundongos, evidenciando claramente o incremento na produção (KARASHIMA et al., 2002).

A melanina é um polímero multifuncional amplamente distribuído nos ambientes naturais. Este tipo de pigmento de alto peso molecular é sintetizado através de reações poliméricas oxidativas a partir de compostos fenólicos e tipicamente apresenta coloração que pode variar do marrom escuro ao preto (HAMILTON; GOMEZ, 2002).

A melanina está presente em várias espécies de fungos patogênicos como: *Fonsecaea pedrosoi* (ALVIANO et al., 2004), *Cryptococcus neoformans* (CASADEVALL et al., 2000; NOSANCHUK et al., 2000), *Exophiala dermatitidis* (POLAK, 1990), *Lacazia loboi* (TABORDA et al., 1999), *Histoplasma capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2002), *Sporothrix schenckii* (MORRIS-JONES et al., 2003), *Blastomyces dermatitides* (NOSANCHUK et al., 2004), *Aspergillus fumigatus* (YOUNGCHIM et al., 2004) e *Paracoccidioides brasiliensis* (GOMEZ et al., 2001; DA SILVA et al., 2006), sendo inclusive associada à virulência em alguns fungos fitopatogênicos (WHEELER; BELL, 1988).

A síntese de melanina também está associada com a virulência de alguns fungos patogênicos para o homem como *E. dermatitidis*, *Aspergillus* spp. e *S. schenckii* (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). A melanização de *C. neoformans* resulta da deposição deste polímero na parede celular do fungo (ROSAS et al., 2000).

As células leveduriformes produzem melanina quando L-DOPA é adicionado ao meio de cultura (DA SILVA et al., 2006). Estudos *in vitro* têm demonstrado que cepas melanizadas de *C. neoformans* são menos susceptíveis aos danos induzidos por radiação UV (WANG; CASADEVALL, 1994a), aos danos oxidativos (WANG; CASADEVALL, 1994b), à fagocitose por macrófagos (WANG et al., 1995) e a drogas antimicrobianas (VAN DUIN et al., 2002) do que cepas não-melanizadas. O tratamento de células melanizadas com enzimas, detergentes e ácidos fortes resulta numa remelanização destas células, preservando seu tamanho e forma originais (NOSANCHUK et al., 2000).

1.10 Suscetibilidade a antifúngicos

A incidência crescente de infecções fúngicas invasivas provocadas por fungos oportunistas tem sido alvo de constante preocupação. As elevadas taxas de mortalidade têm fundamentado a busca por tratamentos cada vez mais eficazes e drogas cada vez mais seguras (GARCIA-MARTOS et al., 2001).

A quantidade de fármacos disponíveis para o tratamento dessas infecções é relativamente limitada, o que configura preocupação para clínicos e microbiologistas envolvidos, principalmente, com o controle dos processos micóticos invasivos. Os polienos, em seu maior representante, anfotericina B; e, os azóis de primeira e segunda geração – cetoconazol, fluconazol e itraconazol, há muitos anos têm sido as drogas de primeira escolha na terapia antifúngica. A anfotericina B é um antibiótico fungicida de largo espectro, mas seus efeitos adversos restringem seu emprego. Já os azóis, são compostos sintéticos de toxicidade reduzida que podem apresentar ação fungicida ou fungistática, mas sua potência é menor do que aquela apresentada pela anfotericina B. O uso freqüente dos azóis na terapia e profilaxia das infecções fúngicas invasivas promoveu o surgimento de resistência em espécies suscetíveis. Para esses casos, o surgimento de novos protocolos terapêuticos que empreguem compostos azólicos modernos como os triazólicos (voriconazol, posaconazol e ravuconazol) e as equinocandinas (caspofungina) podem representar uma alternativa eficaz (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

O CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), centro de referência mundial em testes de sensibilidade, vem propondo desde a década de 1990 a padronização de novos testes para leveduras na tentativa de proporcionar resultados mais rápidos, reprodutíveis e seguros para portadores de infecções de alto risco. A publicação do documento M27-A em 1997 confirmou esse empenho, sugerindo testes para alguns agentes fúngicos emergentes (CLSI, 1997). No entanto, é importante considerar que esses testes ainda são submetidos a trabalhos de pesquisa comparativos, uma vez que, o estabelecimento da CIM (concentração inibitória mínima) depende de inúmeras variáveis, tais como, quantidade de inóculo e tempo de incubação por exemplo (MARR et al., 1999).

As técnicas empregadas para os testes *in vitro* de suscetibilidade a antifúngicos são bastante variadas e compreendem: 1 – diluição em meio líquido (macro e/ou microdiluição); 2 – diluição em meio sólido; e 3 – difusão em meio sólido (discos e fitas), todos submetidos a

avaliações criteriosas que tinham o objetivo de obter máxima eficiência nos testes. A publicação do documento M27-A2 em 2002 descreve os métodos considerados referência pelo CLSI (CLSI, 2002). O E-test constitui um método prático e rápido que emprega fitas adsorvidas com antifúngico em várias concentrações que se difundem proporcionalmente quando colocadas em placas contendo meio sólido. Esse método alternativo proporciona resultados qualitativos, que são obtidos pela visualização de halos de inibição, e quantitativos, determinados pela intersecção entre as linhas do halo de inibição e linha indicativa da concentração da droga expressada na frente da fita (ESPINEL-INGROFF et al., 1992).

Testes *in vitro* de referência atestada têm sido realizados para avaliar a suscetibilidade de leveduras do gênero *Trichosporon*. PAPHITOU et al. (2002), testaram a suscetibilidade de 39 isolados de *Trichosporon* (*T. asahii* [n=24], *T. inkin* [n=5] e *T. mucoides* [n=10]) contra os seguintes antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol. Os MICs (Concentração Inibitória Mínima) para o polieno testado foram relativamente elevados quando comparados àqueles apresentados pelos azólicos. Menores quantidades de fluconazol e itraconazol expressaram bom desempenho contra *Trichosporon*, mas os triazólicos ainda demonstraram superioridade notória em relação a anfotericina B e fluconazol. Os autores concluíram que os azóis demonstraram maior eficiência do que a anfotericina B, e que essa droga não é indicada como único princípio para tratamento da tricosporonose (PAPHITOU et al., 2002).

Garcia-Martos et al. (2001), sugerem que a sensibilidade das diferentes espécies de *Trichosporon* pode variar. *Trichosporon cutaneum*, uma espécie frequentemente associada a infecções superficiais, demonstrou suscetibilidade aos antifúngicos testados (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e 5-fluorocitosina); entretanto, outra espécie, *T. mucoides*, mais associado a processos invasivos, se mostrou resistente a anfotericina B (GARCIA-MARTOS et al., 2001). Outros pesquisadores trazem a informação de que isolados envolvidos com fungemias, como *T. asahii*, já começaram a demonstrar resistência às formulações mais modernas como anfotericina B lipossomal e aos triazólicos, como voriconazol, testadas *in vivo* (BASSETTI et al., 2004).

2 JUSTIFICATIVA

Os avanços da medicina nas últimas décadas, como as técnicas cirúrgicas mais agressivas e o emprego de antibióticos de última geração proporcionaram maior sobrevivência aos pacientes portadores de câncer, Aids, diabetes e transplantados de órgãos. Esses fatores determinam o surgimento de uma nova população de doentes, que por serem imunocomprometidos estão mais sujeitos a infecções por patógenos oportunistas. Alguns deles são considerados emergentes, como os do gênero *Trichosporon*, que são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade entre esses pacientes.

Uma vez que a microbiota residente/transitória caracteriza fonte de infecção para indivíduos imunocomprometidos, estudos ecológicos a respeito da diversidade de espécies de *Trichosporon* que compõem a biota normal da superfície corpórea de seres humanos e animais representam importante passo no estudo da epidemiologia de processos patológicos dessa natureza. O desconhecimento sobre a diversidade fenotípica e fatores associados à virulência das leveduras do gênero *Trichosporon* que ocorrem em nosso meio justificam a presente pesquisa.

3 OBJETIVOS

3.1 investigar a frequência de isolamento, bem como, identificar as espécies de *Trichosporon* que compõe a microbiota superficial da região genital de seres humanos e pelame de animais domésticos e silvestres;

3.2 caracterizar o gênero *Trichosporon* por características bioquímicas gerais e técnica de biologia molecular (PCR);

3.3 identificar as espécies dos isolados de *Trichosporon* spp. que foram confirmados por biologia molecular através de metodologia clássica de assimilação de fontes de carbono, bem como suas características macro e micromorfológicas;

3.4 identificar as espécies dos isolados de *Trichosporon* spp. também através de kit semi-automatizado ID 32 C[®] (Biomerieux[®]);

3.5 avaliar o comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon* quando semeadas em meio diferencial CHROMagar Candida[®] (Difco[®]);

3.6 determinar a produção de enzimas extracelulares (proteínase, fosfolipase, lipase e DNase) por leveduras do gênero *Trichosporon*;

3.7 verificar a expressão de melanina na parede celular de *Trichosporon asahii*;

3.8 verificar a expressão do antígeno polissacarídico glucuronoxilomanana (GMX) na parede celular de amostras de *Trichosporon asahii*;

3.9 traçar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de *Trichosporon* spp. através do método de fitas de difusão E-test[®];

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos ecológicos de *Trichosporon* spp.

4.1.1 Pesquisa em humanos e animais

Amostras foram obtidas através da fricção de quadrados de carpete (MARIAT; ADAM-CAMPOS, 1967) na região perigenital de 83 voluntários de ambos os sexos e aparentemente sadios atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo (UNIFESP/EPM). Com o “termo de consentimento livre esclarecido”, um questionário também foi utilizado nessa pesquisa. Nele foram incluídas perguntas sobre, idade, sexo, etnia, atividade exercida, sintomatologia (prurido local), comportamento sexual e doenças de base. Para descrever as variáveis obtidas por meio do instrumento de pesquisa, foram verificadas a frequência de ocorrência e a porcentagem. A associação entre as diversas variáveis com a proporção de leveduras isoladas foi avaliada por meio da prova exata de Fisher. Aceitou-se a significância estatística em $\alpha \leq 0,05$.

A técnica do quadrado do carpete (MARIAT; ADAM-CAMPOS, 1967), empregada na pesquisa em humanos, também se prestou aos animais utilizados nessa investigação. Vinte e um cães sadios, de diversas raças e ambos os sexos, atendidos em clínica veterinária particular foram submetidos à fricção de quadrados de carpete esterilizados sobre o pelame para a pesquisa e identificação de leveduras patogênicas, com vistas ao gênero *Trichosporon*. As leveduras isoladas foram identificadas pelas suas características microbiológicas (DE HOOG et al., 2000; KURTZMAN; FELL, 1998). Para descrever as variáveis obtidas por meio do instrumento de pesquisa, foram verificadas a frequência de ocorrência e a porcentagem.

Leveduras do gênero *Trichosporon* foram pesquisadas no pelame de 27 tamanduás, provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zôo-Sorocaba, SP), ambos, integrantes do projeto de pesquisa multacentralizado idealizado pelo Grupo de Trabalho pela Conservação do Tamanduá no Brasil (GCTB-IBAMA). Catorze espécimes de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e 13 espécimes de tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*), dos quais, 63% eram machos e 37%,

fêmeas. Para descrever as variáveis obtidas por meio do instrumento de pesquisa, foram verificadas a frequência de ocorrência e a porcentagem.

As coletas foram realizadas após consentimento dos respectivos responsáveis. Tanto os procedimentos de coleta em humanos como em animais atenderam às normas do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Humanos e Animais, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Todas as amostras foram semeadas uniformemente em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD) (Difco®) acrescidas de 0,5% de cloranfenicol (ANEXO A) e incubadas à temperatura ambiente até que fosse evidenciado crescimento. As amostras foram isoladas, repicadas, em triplicata, para tubos contendo o mesmo meio e mantidas viáveis através de repiques periódicos.

4.2 Amostras submetidas a triagem

Foram incluídas na pesquisa, até o momento, 38 isolados presuntivamente identificados como *Trichosporon* sp., dos quais: dois foram provenientes da pesquisa e isolamento realizadas a partir da região genital de pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia UNIFESP; um isolado proveniente da pesquisa de leveduras no pelame de tamanduás; 35 isolados clínicos mantidos em micoteca pelo Laboratório de Micologia do ICB/USP, Disciplina de Microbiologia da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Laboratório de Diagnóstico de Infecções Fúngicas da UNIFESP/EPM e Laboratório de Clínica e Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina Veterinária (UNIP). Quatro amostras-padrão: *T. asahii* (CBS 2479), *T. inkin* (CBS 5585), *T. mucoides* (CBS 7625) e *T. ovoides* (CBS 7556), foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Especial de Micologia UNIFESP/EPM, sendo empregadas como controles em reações. A relação de amostras e suas origens estão na Tabela 1.

Tabela 1: Relação dos isolados leveduriformes incluídos na primeira fase de testes (triagem) da presente investigação. Amostragem compreende 38 leveduras suspeitas de *Trichosporon* e quatro amostras-padrão.

Amostra	Identificação	Origem	Processo	Amostra	Identificação	Origem	Processo
1	<i>T. asahii</i>	Padrão	CBS*	22	EPM 129cc/06	Cabelo	Nódulo
2	<i>T. inkin</i>	Padrão	CBS	23	EPM 130pp/06	Pele	Dermatite
3	<i>T. mucoides</i>	Padrão	CBS	24	ICB 439/98	Sangue	D.I. [#]
4	<i>T. ovoides</i>	Padrão	CBS	25	ICB 45/99	Sangue	D.I.
5	UNIPAR 5	Pele	Nódulo	26	EPM 51/04	Unha mão	Onicomicose
6	UNIPAR 6	Pele	Dermatite	27	EPM 21/05	Cateter	D.I.
7	UNIPAR 7	Cabelo	Nódulo	28	ICB 86/03	Sangue	D.I.
8	UNIPAR 11	Cabelo	Nódulo	29	ICB 492/98	Cateter	D.I.
9	UNIPAR 12	Cabelo	Nódulo	30	ICB 598/98	Urina	D.I.
10	UNIPAR 14	Cabelo	Nódulo	31	ICB 679/98	Urina	D.I.
11	UNIPAR 15	Cabelo	Nódulo	32	UNIP t 01/08	Pelame	Microbiota
12	EPM 2008	Cabelo	Nódulo	33	UNIP t 17/08	Pelame	Microbiota
13	UNIP c 8(2)	Pelame	Microbiota	34	UNIPAR 4	Escarro	D.I.
14	UNIP c 9(2)	Pelame	Microbiota	35	UNIPAR 9	Cabelo	Nódulo
15	UNIP c 15(2)	Pelame	Microbiota	36	UNIPAR 10	Cabelo	Nódulo
16	EPM 14/07	Pele	Microbiota	37	UNIPAR 13	Sangue	D.I.
17	EPM 25pg	Cabelo	Nódulo	38	UNIPAR 16	Cabelo	Nódulo
18	EPM 26pg	Cabelo	Nódulo	39	UNIPAR 17	Sangue	D.I.
19	EPM 83UP	Unha pé	Onicomicose	40	UNIP c 5OD	Pelame	Microbiota
20	EPM 113(3)	Pele	Microbiota	41	UNIP c 13(4)	Pelame	Microbiota
21	EPM 119UM	Unha mão	Onicomicose	42	UNIP c 14(1)	Pelame	Microbiota

*CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures; [#]D.I. = doença invasiva

4.3 Caracterização laboratorial do gênero *Trichosporon*

4.3.1 Testes bioquímicos para a triagem de leveduras do gênero *Trichosporon*

Os isolados de 24-72h mantidos em ASD, suspeitos de pertencerem ao gênero *Trichosporon*, foram submetidos ao teste de produção de urease em meio de ágar uréia de Christensen (CRISTENSEN, 1946) (ANEXO B) e teste de fermentação de carboidratos

(WICKERHAM, 1951) (ANEXO C). Cepas clínicas de *Cryptococcus neoformans* (ICB 162C) e *Candida albicans* (ICB 12A) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

4.3.2 Caracterização molecular de leveduras do gênero *Trichosporon*

4.3.2.1 Extração do DNA genômico

Amostra-padrão de *T. asahii* (CBS 2479) e isolado recente (ICB 86/03), ambas mantidas através de repiques periódicos em meio de ágar Sabouraud dextrose, foram utilizadas na padrinização do experimento. Meio de ágar Sabouraud dextrose (ASD) (Difco®) e Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) foram testados. Os cultivos foram incubados por 24 e 48 horas sob temperatura ambiente. O DNA fúngico foi obtido de acordo com o protocolo sugerido por Gandra et al. (2006). As células foram lavadas em tampão TE 1M, resuspendidas em solução de lise (20 mM Tris-HCl [pH 8,0], 25 mM EDTA e 75 mM NaCl) e tratadas com lisozima (10 mg/mL) e proteinase k (10 mg/mL) (Promega®); a extração foi feita com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1 [vol/vol]) e o DNA, precipitado com isopropanol. O produto de extração das amostras foi lido em Nanodrop® (ND 1000 UV-Vis Spectrophotometer, Wilmington, DE, EUA), considerado ideal, extraído com grau de pureza $\geq 2,0$. Além disso, o material também foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em cuba 3 Loccus® sob voltagem de 85V por aproximadamente uma hora e vinte minutos. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultra-violeta. Lambda Hind III (VJR®) foi empregado como marcador de pares de bases. Após a padronização, todos os 28 isolados foram testados (GANDRA et al., 2006).

4.3.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a verificação conclusiva a respeito da identidade genérica das leveduras foi utilizada metodologia proposta por Sujita et al. (1998), onde foram empregados primers capazes de se alinhar e amplificar apenas a sequência específica de uma região pouco conservada da subunidade-menor do DNA ribossomal (DNAr) de leveduras de importância médica: TRF

(forward) (5'-AGAGGCCTACCATGGTATCA-3') e TRR (reverse) (5'-TAAGACCCAATAGAGCCCTA-3') (Invitrogen®). A reação de amplificação foi conduzida a partir de solução tampão de PCR contendo 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1 mM MgCl₂, 2,5µL de cada oligonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 mM de cada iniciador e 0,5U de GoTaq polimerase (Invitrogen®). A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler ep gradient S 534X (Eppendorf®) utilizando-se o seguinte programa: 94 °C por três minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 15 segundos e 72 °C por 15 segundos, com período de extensão final de 72 °C por 10 minutos. Após o desempenho de ciclos térmicos, o produto do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Bioagency®) em cuba Locus® LCH 20x25 cm a voltagem de 95V durante uma hora e 45 minutos. Após o experimento o gel foi corado por imersão em solução de brometo de etídeo, visualizado em luz ultravioleta e fotografado em filme Polaroid® (SUGITA et al., 1998).

4.4 Amostras selecionadas para a investigação microbiológica

As leveduras que apresentaram características bioquímicas/fisiológicas e moleculares compatíveis com as do gênero *Trichosporon* foram selecionadas para os testes clássicos de identificação das espécies, pesquisa dos fatores associados à virulência e suscetibilidade a antifúngicos.

4.5 Caracterização das espécies de *Trichosporon*

4.5.1 Estudo morfológico aplicado à caracterização de espécies de *Trichosporon*

4.5.1.1 Macromorfologia e crescimento em diferentes temperaturas

Os isolados foram repicados 24-72h antes do experimento. Cultivos foram semeados, em quadruplicatas, no centro de placas contendo ASD. Cada duplicata foi submetida à incubação em 25 °C e 37 °C, respectivamente, durante 15 dias. Foram tomadas as medidas dos cultivos nos dias 0 (zero), 3 (três), 7 (sete) e 15 (quinze). Análise comparativa das medidas apresentadas pelas colônias foi realizada para avaliar o crescimento das amostras sob diferentes temperaturas,

considerando-se as seguintes variáveis: aspecto (úmido e seco); textura (lisa, rugosa); coloração (branca, creme, cinza) e presença/ausência de zona marginal (GUÉHO et al., 1992). Os valores obtidos a partir das medidas das colônias mantidas em 25 °C e 37 °C foram comparados estatisticamente por teste T de Student. Foi considerado significativo valor de $p \leq 0,05$.

4.5.1.2 Micromorfologia

Todos os cultivos de *Trichosporon* spp. foram submetidos à microcultivo em lâmina conforme preconiza Porto et al. (1981). Cada amostra foi semeada em estrias sobre lâminas contendo meio de ágar-fubá acrescido de Tween 80 (ANEXO D). Posteriormente, as estrias foram cobertas com lamínula e cada placa foi incubada a 30 °C durante 24 horas e submetida à leitura para verificação das estruturas fúngicas.

4.5.2 Testes bioquímicos para caracterização de espécies de *Trichosporon*

4.5.2.1 Assimilação de fontes de carbono

A prova de assimilação de compostos de carbono foi realizada conforme descreveram Lodder; Kreger Van-Rij (1970). Uma alçada de levedura foi homogeneizada em 2 mL de água destilada esterilizada. Essa suspensão foi adicionada ao meio de assimilação de fontes de carbono (ANEXO E), o qual, depois de solidificado, recebeu pequenas quantidades de glicose, melibiose, L-arabinose, sorbitol e mio-inositol (DE HOOG et al., 2000) (Quadro 1). As placas foram observadas a fresco e coradas por lugol quanto à formação dos halos de assimilação.

4.5.2.2 Crescimento em meio suplementado com ciclo-heximida

Os isolados foram repicados 24-72h antes do experimento. Inóculos foram semeados, em triplicatas, no centro de placas contendo ASD, ASD acrescido de 0,1% de ciclo-heximida e ASD acrescido de 0,01% de ciclo-heximida. As placas foram incubadas a 30 °C, durante 3 dias. As medidas dos inóculos foram aferidas nos dias 0 e 3. Cada amostra semeada em meio de ASD acrescida de ciclo-heximida possuía uma repetição em ASD que funcionou como seu próprio

controle. Foram consideradas resistentes aquelas amostras que apresentaram crescimento igual ou superior ao verificado no controle semeado em ASD (Quadro 1).

Quadro 1: Identificação esquemática de *Trichosporon* spp. segundo De Hoog et al., 2000.

	<i>T. asahii</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. inkin</i>	<i>T. mucoides</i>	<i>T. ovoides</i>
Arabinose	+	+	-	+	V
Sorbitol	-	+	-	+	-
Melibiose	-	+	-	+	-
Myo-Inositol	-	+	+	+	-
37 °C	+	-	+	+	V
Ciclo-heximida (0,1%)	+	-	V	+	+
Apressório	-	-	+	-	+

4.6 Comportamento cromogênico do gênero *Trichosporon* em CHROMagar Candida®

Na busca e avaliação de métodos rápidos para o isolamento e identificação de leveduras do gênero *Trichosporon*, foi utilizado meio de CHROMagar Candida (Difco®) (ANEXO F) para a verificação do comportamento cromogênico das amostras e possível aplicação na diferenciação das espécies. A pigmentação produzida foi cuidadosamente anotada após a semeadura no meio cromogênico.

4.7 Identificação semi-automatizada (ID 32 C, Biomerieux®)

Para a realização das provas de identificação de *Trichosporon* spp., pelo método ID 32 C, foram utilizados 22 cultivos semeados em ASD e incubados por 24-72h a 30 °C. Suspensão de microrganismos foi preparada em tubos contendo 2mL de água destilada esterilizada de acordo com o tubo 2,0 da escala de MacFarland. Duzentos e cinquenta microlitros (250µL) de cada inóculo foram dispensados numa ampola contendo meio de assimilação de carbono. Após homogeneização, 135µL de cada diluição foram adicionados a cada poço da galeria de ID 32 C, as quais foram incubadas em câmara úmida sob 30 °C de temperatura, durante 72h e submetidas

à leitura a cada 24h, conforme orientação do fabricante. Foram consideradas positivas, as amostras que apresentaram turvação superior à do controle negativo. O perfil numérico obtido na leitura visual foi analisado pelo programa Apiweb[®] (FRICKER-HIDALGO et al., 1996). Foram considerados identificados os isolados que apresentaram níveis de acurácia $\geq 85\%$ à leitura no programa.

4.8 Pesquisa dos fatores associados à virulência

4.8.1 Detecção da produção de enzimas extracelulares

Para todos os testes foram empregados cultivos de até 72h mantidos em ASD. Para a padronização da leitura dos testes de atividade enzimática foram realizadas leituras em 24h, 48h, 72h, cinco dias, sete dias e 15 dias. A atividade enzimática (Pz) foi determinada através do cálculo da razão existente entre a medida do diâmetro da colônia (dc) e a do diâmetro mais o halo produzido (dcd). Os resultados obtidos foram classificados como: negativas (quando $Pz = 1,0$), positivas (quando $Pz \geq 0,64$ e $< 1,0$) ou fortemente positivas (quando $PZ < 0,64$) (PRICE et al., 1982).

4.8.1.1 Atividade de proteinases

A produção de proteinase foi verificada meio teste (ANEXO G) contendo albumina sérica bovina (fração V, Sigma[®]). Uma alçada de inóculo foi semeada no centro de placas contendo o meio teste e estas, incubadas à temperatura de 30 °C. Foram consideradas como produtoras de proteinase as amostras que, assim como o controle positivo, foram capazes de produzir um halo translúcido, que correspondia à degradação do substrato (albumina bovina). Solução corante e solução reveladora foram empregadas para melhor evidenciar os halos. Cepa de *C. albicans* (ICB 12A) foi utilizada como controle positivo da reação (RUCHEL et al., 1982).

4.8.1.2 Atividade de fosfolipases

A análise foi feita em meio (ANEXO H) contendo gema de ovo homogeneizada. Uma alçada de inóculo foi semeada no centro de placas contendo o meio teste de fosfolipase e estas, incubadas à temperatura de 37 °C. Foram consideradas como produtoras de fosfolipase as amostras que, assim como o controle positivo foram capazes de produzir um halo opaco. Cepa de *C. albicans* (ICB 12A) foi utilizada como controle positivo do teste (PRICE et al., 1982).

4.8.1.3 Atividade de lipases

A análise foi feita em meio contendo Tween 20 (20%). Uma alçada de inóculo foi semeada no centro de placas contendo o meio teste de lipase (ANEXO I) e estas, incubadas à temperatura de 25 °C. Foram consideradas como produtoras de lipase as amostras que, assim como o controle positivo foram capazes de produzir um halo opaco. Cepa de *Malassezia pachydermatis* (ICB 145) foi utilizada como controle positivo do teste de detecção da atividade de lipase (MUSHIN et al., 1997).

4.8.1.4 Atividade de DNases

A análise foi feita em meio comercial DNase test agar (Oxoid®). Uma alçada de inóculo foi semeada no centro de placas contendo o meio teste de DNase (ANEXO J) e estas, incubadas à temperatura de 25 °C. Foram consideradas como produtoras de DNase as amostras que, assim como o controle positivo foram capazes de produzir um halo de precipitação. Cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada como controle positivo do teste de detecção da atividade de DNase (LOPEZ-MARTINEZ et al., 1994).

4.8.2 Detecção de melanina em parede celular de *Trichosporon asahii*

4.8.2.1 Amostras testadas e metodologia

Foram empregadas nessa pesquisa duas cepas de *T. asahii*, amostra-padrão CBS 2479 e ICB 86/03, ambas mantidas na micoteca do Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina (EPM), em São Paulo, SP. Foi empregada metodologia segundo Da Silva et al. (2006).

4.8.2.2 Cultivo dos isolados

As amostras foram semeadas em meio de ASD e incubadas a 36 °C, durante 12 dias. Após este período as cepas foram transferidas para frascos tipo Erlemmeyer de 200mL contendo meio líquido quimicamente definido (RESTREPO; JIMENEZ, 1980) e incubadas a 36 °C, durante 12 dias, sob agitação constante (200rpm).

4.8.2.3 Indução da produção de melanina por *Trichosporon asahii*

As cepas de *Trichosporon asahii* (CBS 2479 e ICB 86/03) foram semeadas em meio líquido quimicamente definido [15,0 mM de glicose; 10,0 mM de MgSO₄; 29,4 mM de KH₂PO₄; 13,0 mM de glicina; 3,0 µM de vitamina B1 (pH 5.5)], na presença ou na ausência de 1,0 mM de L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), a 36 °C, sob agitação constante (200 rpm) durante até 12 dias. Todos os frascos foram incubados em ausência de luz para prevenir fotopolimerização da L-DOPA. Amostras de *C. neoformans* (ICB 162C) e *C. albicans* (ICB 12A) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

4.8.2.4 Análise colorimétrica da atividade da lacase (DA SILVA et al., 2006)

As células de *T. asahii* (CBS 2479 e ICB 86/03), de *C. albicans* (ICB 12A) e *C. neoformans* (ICB 162C) foram lavadas três vezes com solução de PBS (Phosphate Buffer

Solution) e ressuspendidas em meio de asparagina com glicose (6mM de asparagina; 1 M de Na_2HPO_4 [pH 6,5]; 0,4 mM de MgSO_4 ; 0,5 M de CaCl_2 ; 16 mM de glicose). Os controles foram incubados a 30 °C; as amostras de *T. asahii* foram incubadas a 36 °C durante 12 horas. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com meio de asparagina sem glicose, ressuspendidas no mesmo meio e incubadas nas mesmas temperaturas citadas anteriormente, por 48 horas. Finalmente, as células foram lavadas extensivamente com solução PBS. Cerca de 100 μL de uma solução 10 mM de ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)] (Roche® Laboratories; Indianápolis, IN) foi adicionada à 900 μL de uma solução 50 mM de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) contendo 10^8 células/mL e, em seguida, incubadas por duas horas nas mesmas condições citadas. Por fim as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (DU640, Beckman®, EUA) a 420 nm.

4.8.2.5 Detecção da produção de melanina

As amostras submetidas a crescimento em meio com e sem indutor (L-DOPA) da produção de melanina, foram estudadas quanto à expressão daquele polímero na sua parede celular. Para tanto, foi empregada técnica de microscopia eletrônica de transmissão para demonstrar a presença de melanina na parede de *T. asahii*.

4.8.2.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Células de *T. asahii* foram lavadas três vezes com PBS, fixadas em solução de glutaraldeído 2% e incubadas à temperatura ambiente, por duas horas. Após esse período as células foram incubadas em solução PBS, acrescida de 2,5% de formaldeído e 2% de glutaraldeído, em temperatura ambiente por 12 horas. Em seguida, as leveduras foram fixadas em 2% de ósmio. A desidratação foi realizada por lavagens sucessivas de etanol 50 a 90% por 10 minutos e duas últimas lavagens em etanol absoluto, por 15 minutos (WANG et al., 1995). As células foram embebidas em resina Spurr e cortadas em ultramicrotomo (MT2-B, Sorvall, EUA). Todas as preparações foram examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1010, JOEL, Japão).

4.8.3 Detecção de antígeno glucuronoxilomanana (GXM)

4.8.3.1 Amostras testadas

Para o teste de detecção do antígeno polisacarídico glucuronoxilomanana (GXM) foram utilizadas: cepa-padrão *T. asahii* (CBS 2479) e ICB 86/03. Cepa de *Cryptococcus neoformans* (ICB 162C) e *Candida albicans* (12A), foram empregadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

4.8.3.2 Imunofluorescência direta

Os isolados empregados nesse estudo foram semeados em caldo Sabouraud dextrose e incubados a 30 °C durante 72 horas sob agitação constante (200 rpm). Após a incubação, os cultivos foram transferidos para tubos Falcon esterilizados e centrifugados em aparelho 5415D (Eppendorf®) a 3000 rpm durante cinco minutos e submetidas a duas lavagens em solução tampão fosfato (PBS). Concentração de células igual a 1×10^6 células por mililitro foi transferida para tubos cônicos (Eppendorf®), centrifugadas (3000 rpm/5min) e fixadas em solução de paraformaldeído 4%. Após uma hora, os tubos foram centrifugados (3000 rpm/5min), o sobrenadante descartado e as células, submetidas a três lavagens em solução PBS e em seguida centrifugadas (3000 rpm/5min). A solução foi bloqueada pela adição de 100 µL de solução de albumina bovina (BSA) a 3% e incubação a 37 °C durante uma hora. O material foi submetido a nova centrifugação para retirada do BSA e adição de 100 µL do anticorpo primário monoclonal 18B7 anti-GXM (10 µg/mL), incubadas a 37 °C por uma hora. Após a incubação as amostras foram submetidas a três lavagens com PBS antes da adição de 100 µL de anticorpo secundário associado a conjugado (1:100) (anti-IgG de camundongo biotinizado [0,5 mg/mL] + estreptoavidina marcada com isotiocianato de fluoresceína [0,5 mg/mL]). Finalmente, cada amostra foi observada em microscópio de fluorescência (Eclipse E600, Nikon®, Japão), fotografada em câmera digital (DXM 1200F, Nikon®, Japão) com auxílio do software específico (ACT 1 versão 2.63, Nikon®, Japão) (PINTO et al., 2002).

4.9 Teste de sensibilidade a antifúngicos (E-test[®])

Cultivos de *Trichosporon* spp. com 24-48h serão analisados quanto ao seu perfil de sensibilidade a antifúngicos pelo emprego de fitas E-test[®] (AB Biodisk, Solna, Suécia) contendo os seguintes antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol, voriconazol e caspofungina. As fitas serão armazenadas em freezer -20 °C até o uso. Os inóculos serão preparados com cultivos recentes diluídos em solução salina 0,9% esterilizada. A turbidez do inóculo será de acordo com o tubo 2,0 da escala de McFarland. Será empregado meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab[®]) com L-glutamina e sem bicarbonato [pH 7,0] com tampão MOPS (3N-morpholino propanesulfonic acid) 0,165 M (Sigma[®]) e suplementado com 18g/L de glicose (CLSI, ex-NCCLS, 2002). Cada amostra será semeada com auxílio de zaragatoas esterilizadas em placas de Petri contendo o meio de cultura mencionado e incubadas a 30 °C durante 48 a 72 horas. A interpretação dos resultados será realizada conforme critérios estabelecidos pelo fabricante, uma vez que, até o momento, não existem “breakpoints” estabelecidos para *Trichosporon* spp.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos ecológicos de *Trichosporon* spp.

5.1.1 Pesquisa e isolamento de amostras de *Trichosporon* spp. em seres humanos

De maneira geral, a população incluída na investigação era predominantemente constituída por mulheres (80,7%). A média de idade da população foi de 53,7 anos, variando de 15 a 87 anos (Tabela 2). De acordo com as variações étnicas avaliadas, observou-se que nesta população 58 (69,9%) eram brancos, 18 (27,7%) negros, 6 (7,2%) pardos e 1 (1,2%) amarelo.

Tabela 2. Análise da distribuição por faixa etária, dos 83 pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo, UNIFESP-EPM (junho/06 a abril/07).

Idade (anos)	n	%
15 – 39	14	16,9
40 – 63	38	45,8
64 – 87	31	37,3
Total	83	100,0

Diferentes atividades foram relatadas. A atividade doméstica foi prevalente, correspondendo a 72,3% dos pacientes, as demais ocupações foram em ordem decrescente: estudante (6,5%), administrador e “staff” médico (5,5% cada um) e outras ocupações (10,2%). Dos 83 pacientes examinados 23 (27,7%) relataram prurido na região genital, enquanto 60 (72,3%) não apresentaram qualquer tipo de sintoma. Não foi possível estabelecer associações estatisticamente significativas entre as variáveis (idade, sexo e etnia) estudadas e as leveduras isoladas nesta investigação.

A partir da fricção de quadrados de carpete na pele da região genital dos 83 pacientes investigados foram obtidos no total, 108 isolados fúngicos, dos quais 74 (68,5%) correspondiam a fungos leveduriformes. As demais amostras semeadas (31,5%) foram consideradas negativas para crescimento de leveduras. *Trichosporon inkin* foi isolado de 2,4% (2/83) dos pacientes

pesquisados - os dois pacientes eram do sexo feminino. Os demais gêneros de leveduras isoladas foram *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp. e representando 66,1% dos isolados (Figura 1).

Figura 1. Leveduras isoladas da pele da região genital dos 83 pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo, UNIFESP-EPM (junho/06 a abril/07).

O gênero *Candida* apresentou notável relevância entre os isolados de leveduras. *Candida* não-*albicans* representaram 67,6% das amostras, enquanto *C. albicans* 0,9% delas. Os demais isolados foram bactérias e fungos filamentosos (31,5%).

As espécies de *Candida* prevalentes na pele da região genital dos pacientes pesquisados foram, em ordem decrescente: *C. parapsilosis* (52,7%), *C. tropicalis* (8,1%), *C. guilliermondii* (5,4%) e *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae* (1,35%), *C. albicans* (0,9%). *Rhodotorula mucilaginosa* (13,5%) e *R. glutinis* (12,2%) foram outras duas espécies de leveduras encontradas na presente investigação. A lista completa de leveduras isoladas da região perifgenital de 83 pacientes estudados pode ser visualizada na Tabela 3.

Tabela 3. Espécies de leveduras isoladas na pele da região genital de 83 pacientes atendidos pelo ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo, UNIFESP-EPM (junho/06 a abril/07).

Espécie da levedura	N	%
<i>C. parapsilosis</i>	39	52,7
<i>C. tropicalis</i>	6	8,1
<i>C. guilliermondii</i>	4	5,4
<i>C. albicans</i>	1	1,35
<i>C. krusei</i>	1	1,35
<i>C. glabrata</i>	1	1,35
<i>C. lusitaniae</i>	1	1,35
<i>R. mucilaginosa</i>	10	13,5
<i>R. glutinis</i>	9	12,2
<i>T. inkin</i>	2	2,7
Total	83	100

5.1.2 Pesquisa e isolamento de amostras de *Trichosporon* spp. em animais

5.1.2.1 Leveduras em microbiota de cães sadios

Trichosporon spp. não foram identificados no pelame dos 21 cães sadios pesquisados. *Candida albicans* (95,2%) e *R. mucilaginosa* (4,8%).foram leveduras isoladas.

5.1.2.2 Leveduras em microbiota de tamanduás sadios

Foram isoladas 30 leveduras a partir das amostras de pelame de 27 tamanduás (Figura 2 e 3). *Trichosporon asahii* foi isolado de dois espécimes, um de tamanduá-mirim e outro de tamanduá-bandeira, ambos machos. Esse isolamento representou 6,7% do total de leveduras isoladas. Mais de um isolado leveduriforme por amostra foi obtido em alguns casos, inclusive naqueles cultivos a partir dos quais foram obtidos os isolados *Trichosporon* sp.

Figura 2. Tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) (A) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) (B), provenientes do Parque Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba, SP).

Figura 3. Colheita de amostra de pelame em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) (A) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) (B) provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (Zoo-SP) através da técnica do carpete (MARIAT; ADAM-CAMPOS, 1967).

As demais espécies isoladas foram: *Candida guilliermondii* (n=8), *C. famata* (n=3), *C. kefyr* (n=3), *C. glabrata* (n=2), *Cryptococcus laurentii* (n=3), *C. humicola* (n=1), *Geotrichum candidum* (n=6) e *Rhodotorula glutinis* (n=2) (Tabela 4).

Tabela 4: Isolamento de leveduras da microbiota do pelame de 27 tamanduás sadios provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZ-SP) e Parque Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba-SP).

Espécie	Sexo	Nº amostra	Identificação da amostra	Identificação do isolado
T. bandeira	Macho	01	28666	<i>Rhodotorula glutinis</i>
T. bandeira	Fêmea	02	14777	<i>Candida kefir</i>
T. bandeira	Macho	03	22760	<i>Candida famata</i>
				<i>Trichosporon asahii</i>
T. bandeira	Macho	04	25106	<i>Candida guilliermondii</i>
T. bandeira	Macho	05	16446	<i>Geotrichum candidum</i>
T. bandeira	Macho	06	22759	<i>Cryptococcus laurentii</i>
T. bandeira	Macho	07	27109	<i>Cryptococcus laurentii</i>
T. mirim	Macho	08	25848	<i>Cryptococcus humicola</i>
T. mirim	Macho	09	28097	<i>Candida kefir</i>
T. mirim	Macho	10	20979	<i>Candida famata</i>
T. mirim	Fêmea	11	20679	<i>Candida guilliermondii</i>
T. mirim	Macho	12	28948	<i>Candida glabrata</i>
T. mirim	Fêmea	13	28949	<i>Geotrichum candidum</i>
T. bandeira	Macho	14	MC38484	<i>Candida guilliermondii</i>
T. mirim	Fêmea	15	22442	<i>Candida guilliermondii</i>
T. mirim	Macho	16	23885	<i>Geotrichum candidum</i>
T. mirim	Macho	17	28639	<i>Candida guilliermondii</i> , <i>Trichosporon asahii</i>
T. mirim	Fêmea	18	28869	<i>Candida guilliermondii</i>
T. bandeira	Macho	19	TB001	<i>Candida glabrata</i>
T. bandeira	Macho	20	TB002	<i>Candida kefir</i>
T. bandeira	Fêmea	21	TB003	<i>Candida famata</i>
T. bandeira	Fêmea	22	TB004	<i>Geotrichum candidum</i>
T. bandeira	Fêmea	23	TB005	<i>Geotrichum candidum</i>
T. bandeira	Fêmea	24	TB006	<i>Candida guilliermondii</i>
T. mirim	Fêmea	25	TM001	<i>Candida guilliermondii</i>
T. mirim	Macho	26	TM002	<i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i>
T. mirim	Macho	27	TM003	<i>Geotrichum candidum</i>

5.2 Caracterização laboratorial do gênero *Trichosporon*

5.2.1 Testes bioquímicos empregados na caracterização do gênero *Trichosporon*

Das 38 amostras testadas para produção de urease, 81,6% (31/38) foram positivas no teste (Figura 4A e Tabela 6). Em relação à avaliação da capacidade de fermentação de carboidratos, foi possível verificar que em 73,7% dos casos não houve formação de gás visível no tubo de Duran, tal qual observado para o controle positivo *C. albicans* (Figura 4B-3 e Tabela 6).

As amostras-padrão *T. asahii* (CBS 2479), *T. inkin* (CBS 5585), *T. mucoides* (CBS 7625) e *T. ovoides* (CBS 7556), empregadas como controles, apresentaram positividade para produção de urease e negatividade para fermentação de carboidratos.

Figura 4. Teste de produção de urease em meio de ágar uréia de Christensen, A1: controle positivo (*C. neoformans*), A2: controle negativo (*C. albicans*) e A3: amostra testada (*Trichosporon* sp). Em B: teste de fermentação de carboidratos, B1: controle negativo (sem inóculo), B2: amostra (*Trichosporon* sp) e B3: controle positivo (seta indica fermentação positiva de *C. albicans*).

5.2.2 Caracterização molecular de leveduras do gênero *Trichosporon*

5.2.2.1 Extração do DNA genômico (GANDRA et al., 2006)

Os isolados de *T. asahii* semeados em ASD apresentaram melhor rendimento do que os semeados em YEPD. Foi possível verificar que o cultivo semeado em ASD e incubado por 48h apresentou relação de pureza e concentração de DNA igual a 2,02. Os valores da leitura podem ser observados na Tabela 5.

Alguns isolados clínicos testados apresentaram aumento considerável de viscosidade durante a adição das enzimas de lise da parede celular (lisosima e proteinase k). Isso foi, particularmente mais intenso em isolados clínicos recentes. Além disso, resíduos de RNA foram notados ao final do gel de agarose, após realização da eletroforese. O cultivo *T. asahii* (CBS 2479) semeado em YEPD e incubado por 24h não apresentou precipitação do DNA após incubação em 20 °C negativos.

Um segundo teste foi conduzido, desta vez contemplando todas as amostras suspeitas. No entanto, as seguintes modificações foram adotadas: (i) os 5µL de RNase, inicialmente utilizados, foram aumentados para 6µL; (ii) o tempo de incubação nessa fase também foi alterado, passado de 30 minutos para 60 minutos, no intuito de diminuir os resíduos verificados no gel; e, finalmente, 500µL de etanol 70% foram adicionados à cada amostra que não apresentou precipitação do DNA.

De maneira geral, as amostras se mostraram mais puras na ocasião do segundo teste, apresentando, inclusive, menor viscosidade. Nenhuma diferença foi observada quanto à presença de resíduos de RNA no gel de eletroforese, assim, essa alteração foi desconsiderada no protocolo. As amostras que, como *T. asahii* (CBS 2479), não apresentaram precipitação do DNA o fizeram após a adição de 500µL de etanol 70% e a incubação em 20 °C negativos “overnight”. Não foi detectada banda correspondente à amostra nº20 após a reação de eletroforese. O material genético de todas as demais amostras pode ser visualizado no mesmo teste (Figura 5).

5.2.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) (SUGITA et al., 1998)

A reação de eletroforese realizada após a amplificação do material genético de 38 isolados leveduriformes de importância médica revelou 19 bandas de 170 pares de bases (Figura 6). A imagem invertida do mesmo gel de eletroforese evidenciou mais cinco bandas que se expressavam fracamente (Figura 7). Sendo assim, dos 38 isolados testados, 24 expressaram bandas compatíveis com as apresentadas pelo gênero *Trichosporon* (Tabela 6).

Tabela 5: Determinação da quantidade e grau de pureza do extraído das amostras de *Trichosporon* sp. em aparelho Nanodrop[®]

Amostra	Meio de semeadura	Tempo de Incubação	Concentração de DNA (ng/μL)	Relação de pureza 260/280 (>= 2.0)
<i>T. asahii</i> (CBS 2479)	YEPD*	24h	63,8	1,99
<i>T. asahii</i> (CBS 2479)	YEPD	48h	85,0	1,96
<i>T. asahii</i> (CBS 2479)	ASD**	24h	160,6	1,91
<i>T. asahii</i> (CBS 2479)	ASD	48h	195,0	2,02
<i>T. asahii</i> (ICB 86/03)	YEPD	24h	77,3	1,77
<i>T. asahii</i> (ICB 86/03)	YEPD	48h	63,6	1,58
<i>T. asahii</i> (ICB 86/03)	ASD	24h	112,9	1,70
<i>T. asahii</i> (ICB 86/03)	ASD	48h	60,3	1,88

* Yeast Extract Peptone Dextrose.

** ágar Sabouraud dextrose.

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto da extração de DNA genômico bruto de 42 isolados de *Trichosporon* spp. Marcador Lambda hind III VJR[®] (M).

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto do PCR de 38 isolados leveduriformes de importância médica presuntivamente identificados como *Trichosporon* spp. Visualização de 19 bandas de aproximadamente 170pb, compatível com gênero *Trichosporon*. Nota-se formação de bandas com intensidade fraca, pouco visíveis em imagem normal. Marcador Lambda hind III VJR® (M). Controles positivos da reação: *T. inkin* (CBS 5585) (2) e *T. ovoides* (CBS 7556) (4). Controles negativos: água destilada, deionizada e esterilizada (Br).

Figura 7: Imagem invertida da eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto do PCR de 38 isolados leveduriformes de importância médica presuntivamente identificados como *Trichosporon* spp. Confirmação do total de 24 bandas de aproximadamente 170pb, compatíveis com gênero *Trichosporon*. Nota-se formação de bandas com intensidade fraca, pouco visíveis em imagem normal. Marcador Lambda hind III VJR® (M). Controles positivos da reação: *T. inkin* (CBS 5585) (2) e *T. ovoides* (CBS 7556) (4). Controles negativos: água destilada, deionizada e esterilizada (Br).

5.2.3 Amostragem selecionada

Além dos quatro controles, 24 das 38 amostras suspeitas submetidas a testes de triagem, se enquadraram dentro dos critérios estabelecidos previamente: urease positiva, fermentação negativa e compatibilidade com a sequência de bases dos iniciadores correspondentes a subunidade menor do DNA ribossomal, empregados em teste de PCR. A relação das amostras e conjunto de características podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6: Relação dos isolados leveduriformes selecionados para caracterização microbiológica, segundo testes de triagem para identificação do gênero *Trichosporon*.

Amostra	Urease	Fermentação	PCR	Amostra	Urease	Fermentação	PCR
1	+	-	+	22	+	-	-
2	+	-	+	23	+	-	+
3	+	-	+	24	+	-	+
4	+	-	+	25	+	-	+
5	+	-	+	26	+	-	+
6	-	+	-	27	-	-	-
7	-	+	-	28	+	-	+
8	+	-	+	29	+	-	+
9	+	-	+	30	+	-	+
10	+	+	-	31	+	-	+
11	+	+	-	32	+	-	+
12	+	+	-	33	+	-	+
13	+	-	+	34	+	-	+
14	+	-	+	35	+	-	+
15	-	+	-	36	+	-	-
16	-	+	-	37	+	+	-
17	+	-	+	38	+	-	+
18	+	-	+	39	+	-	-
19	+	-	+	40	+	-	+
20	-	+	-	41	+	-	+
21	-	+	-	42	+	-	+

5.3 Caracterização das espécies de *Trichosporon* (DE HOOG et al., 2000)

5.3.1 Estudo morfológico empregado na caracterização das espécies de *Trichosporon*

5.3.1.1 Macromorfologia e crescimento sob diferentes temperaturas

De maneira geral, os cultivos de *Trichosporon* mantidos em temperatura ambiente (25 °C) apresentaram textura rugosa (64,3% [18/28]), aspecto seco e opaco (85,7% [24/28]) e presença de zona marginal (82,1% [23/28]). Coloração branca e superfície pulverulenta foram observadas em 50% (14/28) e 64,3% (18/28) das amostras, respectivamente. Nenhum isolado demonstrou tonalidade acinzentada (Tabela 7).

Repiques mantidos em 37 °C expressaram textura predominantemente lisa (71,4% [20/28]), aspecto úmido e brilhante (53,6% [15/28]) e coloração creme (100% [28/28]). Superfície pulverulenta pode ser observada em 64,3% (18/28) dos cultivos. Da mesma forma que para as amostras mantidas em temperatura ambiente, neste caso (37 °C), também não foram observadas colônias de coloração acinzentada (Tabela 7).

Trichosporon asahii mantidos em 25 °C apresentaram textura rugosa em 100% (13/13) dos casos. Já, aqueles mantidos em 37 °C expressaram essa mesma característica com menor frequência (61,5% [8/13]). O aspecto seco e opaco nessa espécie, foi predominante tanto em 25 °C (100% [13/13]) como 37 °C (61,5% [8/13]). Da mesma forma, a superfície pulverulenta foi observada em todos os isolados mantidos a 25 °C e em 76,9% (10/13) daqueles incubados a 37 °C. A coloração creme foi expressa em aproximadamente metade (53,8%) das amostras em 25 °C e quase totalidade das mesmas (76,9% [10/13]) quando incubadas em 37 °C. Apenas nos isolados mantidos em temperatura ambiente foi possível observar pequena faixa plana compatível com uma zona marginal (Figura 8).

Textura rugosa, de aspecto cerebriforme, seco e opaco foram observados em 80% (4/5) das amostras identificadas como *T. inkin*. Ao contrário, esses mesmos cultivos, quando mantidos em 37 °C, apresentaram textura lisa e aspecto úmido e brilhante na periferia em sua totalidade. Todos os isolados de *T. inkin* expressaram superfície pulverulenta. No entanto, aqueles mantidos em 37 °C o fizeram apenas no centro. A coloração das amostras variou conforme a temperatura de incubação, sendo predominantemente branca nos cultivos mantidos a 25 °C e creme nos mantidos

em 37 °C, ambos na mesma proporção (80% [4/5]). Não foram observadas zonas marginais (Figura 9 e 10).

Não foram observadas diferenças morfológicas significativas entre os cultivos de *T. mucoides* incubados em diferentes temperaturas. Textura lisa da colônia e aspecto úmido e brilhante, com ausência de substância farinácea superficial foi verificada em 100% (4/4) dos isolados. A cor creme também predominou nessas amostras e representou 75% (3/4) e 100% (4/4) nas temperaturas de 25 °C e 37 °C, respectivamente.

As colônias de *T. ovoides* se apresentaram freqüentemente planas e de textura lisa (100% [6/6]). O aspecto seco e opaco (83,3% [5/6]) daquelas mantidas em 25 °C foi constante durante o período de incubação; entretanto, as mesmas amostras incubadas em 37 °C apresentaram aspecto inicialmente mais úmido (100% [6/6]) e brilhante (83,3% [5/6]), especialmente entre o terceiro e o sétimo dias, tornando-se secas e opacas posteriormente. A coloração creme foi predominante em ambas as temperaturas (25 °C = 100% e 37 °C = 83,3%). Todos os cultivos matidos em temperatura ambiente apresentaram zona marginal. Apenas metade destes, o fizeram quando incubados a 37 °C (Figura 11).

O teste T de Student evidenciou diferença significativa em apenas três das 28 amostras examinadas. Duas correspondentes a isolados de *T. asahii* [UNIPc9(2) e UNIPAR 4] e uma de *T. ovoides* (EPM83up), que expressaram melhor crescimento em 37 °C (Tabela 8). Em relação aos demais isolados, não houve diferença estatisticamente significante. As medidas das colônias incubadas em 25 °C e 37 °C podem ser visualizada na Tabela 8.

Tabela 7. Características macromorfológicas de espécies de *Trichosporon* estudadas através de cultivo em placa de petri contendo meio de ágar Sabouraud dextrose e incubadas sob diferentes temperaturas, durante 15 dias.

Amostra	Espécie	Característica																					
		Textura				Aspecto								Cor						Zona			
		Lisa		Rugosa		Seca		Úmida		Opaca		Brilho		Pulverulência		Branca		Creme		Cinza		Marginal	
		25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C		
CBS 2479	<i>T. asahii</i>			X	X					X	X			X	X			X	X			X	
CBS 5585	<i>T. inkin</i>		X	X		X			X	X			X	X	X	X			X				
CBS 7625	<i>T. mucoides</i>	X	X					X	X				X	X				X	X			X	X
CBS 7556	<i>T. ovoides</i>	X	X			X			X	X			X					X	X			X	X
UNIPAR 5	<i>T. mucoides</i>	X	X					X	X				X	X			X		X			X	X
UNIPAR 11	<i>T. ovoides</i>	X	X			X			X	X			X					X	X			X	X
UNIPAR 12	<i>T. ovoides</i>	X	X			X			X	X			X					X	X			X	X
UNIP c 8(2)	<i>T. asahii</i>			X	X					X	X			X	X	X			X			X	
UNIP c 9(2)	<i>T. asahii</i>			X	X					X	X			X	X			X	X			X	
EPM 25pg	<i>T. inkin</i>		X	X		X			X	X			X	X	X	X			X				
EPM 26pg	<i>T. inkin</i>		X	X		X			X	X			X	X	X	X			X				
EPM 83up	<i>T. ovoides</i>	X	X			X			X	X			X					X	X			X	
EPM 130pp/06	<i>T. ovoides</i>	X	X			X			X	X			X					X	X			X	
ICB 439/98	<i>T. mucoides</i>	X	X					X	X				X	X				X	X			X	X
ICB 45/99	<i>T. asahii</i>			X	X					X	X			X	X	X			X			X	
EPM 51um/04	<i>T. inkin</i>		X	X		X			X	X			X	X	X	X			X				
ICB 86/03	<i>T. asahiii</i>			X	X					X	X			X	X	X			X			X	
ICB 492/98	<i>T. asahii</i>			X	X					X	X			X	X	X			X			X	
ICB 598/98	<i>T. mucoides</i>	X	X					X	X				X	X				X	X			X	X
ICB 679/98	<i>T. asahii</i>			X	X					X	X			X	X	X			X			X	
UNIP t 01/08	<i>T. asahii</i>			X	X					X	X			X	X	X			X			X	

Continua...

Tabela 7. (Continuação)

Amostra	Espécie	Característica																					
		Textura				Aspecto								Cor						Zona			
		Lisa		Rugosa		Seca		Úmida		Opaca		Brilho		Pulverulência		Branca		Creme		Cinza		Marginal	
		25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
UNIP t 17/08	T. asahii		X	X				X	X			X	X			X	X						
UNIPAR 4	T. asahii		X	X				X	X			X	X			X	X						
UNIPAR 9	T. inkin	X	X		X			X	X			X	X	X	X			X	X				
UNIPAR 16	T. ovoides	X	X					X	X			X				X	X						X
UNIP c 5OD	T. asahii		X	X				X	X			X	X	X			X	X					
UNIP c 13(4)	T. asahii		X	X				X	X			X	X			X	X						
UNIP c 14(1)	T. asahii		X	X				X	X			X	X	X			X	X					

T. = *Trichosporon*

EPM = Escola Paulista de Medicina

ICB = Instituto de Ciências Biomédicas

UNIVAP = Universidade do Vale do Paraíba

UNIP = Universidade Paulista

Tabela 8. Medidas do diâmetro (milímetros) das colônias de *Trichosporon* spp. durante o período de incubação em diferentes temperaturas em meio de ágar Sabouraud dextrose.

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Data do isolamento	Espécie	Incubação							
					Dia 0		Dia 3		Dia 7		Dia 15	
					25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
CBS 2479	Padrão	-	-	<i>T. asahii</i>	8	8	21	15	26	15	40	32
CBS 5585	Padrão	-	-	<i>T. inkin</i>	6	6	20	21	20	36	33	36
CBS 7625	Padrão	-	-	<i>T. mucoides</i>	7	7	20	41	21	65	31	68
CBS 7556	Padrão	-	-	<i>T. ovoides</i>	5	7	22	30	22	30	52	31
UNIPAR 5	Dermatite	Pele da face	2002	<i>T. mucoides</i>	6	7	15	37	19	39	38	43
UNIPAR 11	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovoides</i>	7	6	26	13	30	23	33	33
UNIPAR 12	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovoides</i>	6	7	34	31	41	38	41	42
UNIP c 8(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	6	6	12	23	42	53	47	54
UNIP c 9(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	5	7	13	25	41	50	49	54
EPM 25pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	7	5	36	50	42	50	50	51
EPM 26pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	6	7	56	21	56	36	58	37
EPM 83up	Onicomiose	Unha do pé	2005	<i>T. ovoides</i>	6	8	17	30	21	38	32	42
EPM 130pp/06	Dermatite	Pele do pé	2006	<i>T. ovoides</i>	6	7	11	34	13	34	40	41
ICB 439/98	Trichosporonose	Sangue	1998	<i>T. mucoides</i>	6	5	41	33	42	42	42	47
ICB 45/99	Trichosporonose	Sangue	1999	<i>T. asahii</i>	6	7	11	7	11	9	19	25
EPM 51um/04	Onicomiose	Unha da mão	2004	<i>T. inkin</i>	7	9	50	9	51	9	51	10
ICB 86/03	Trichosporonose	Sangue	2003	<i>T. asahiii</i>	6	5	9	6	11	6	30	9
ICB 492/98	Trichosporonose	Cateter	1998	<i>T. asahii</i>	7	6	26	13	30	23	33	33

ICB 598/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. mucoides</i>	6	7	34	31	41	38	41	42
------------	-----------------	-------	------	--------------------	---	---	----	----	----	----	----	----

Continua...

Tabela 8 (Continuação)

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Idade	Espécie	Incubação							
					Dia 0		Dia 3		Dia 7		Dia 15	
					25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
ICB 679/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. asahii</i>	5	8	9	11	11	11	14	11
UNIP t 01/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	8	6	11	23	44	53	51	54
UNIP t 17/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	6	8	17	30	21	38	32	42
UNIPAR 4	Trichosporonose	Escarro	2001	<i>T. asahii</i>	7	10	57	33	62	37	66	40
UNIPAR 9	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. inkin</i>	6	7	11	34	13	34	40	41
UNIPAR 16	Piedra branca	Cabelo	2005	<i>T. ovoides</i>	5	5	15	13	26	20	32	30
UNIP c 5OD	Microbiota	Conduto auditivo	2007	<i>T. asahii</i>	6	7	13	23	38	53	49	55
UNIP c 13(4)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	6	5	15	21	42	48	50	52
UNIP c 14(1)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	5	5	12	22	44	53	54	54

T. = *Trichosporon*

EPM = Escola Paulista de Medicina

ICB = Instituto de Ciências Biomédicas

UNIVAP = Universidade do Vale do Paraíba

UNIP = Universidade Paulista

Figura 8: Comparação das características macromorfológicas apresentadas por cultivos de *T. asahii* CBS 2479 com três (A), sete (B) e quinze (C) dias de incubação a 25 °C (primeira linha) e três (D), sete (E) e quinze (F) dias a 37 °C (segunda linha).

Figura 9: Comparação das características macromorfológicas apresentadas por cultivos de *T. inkin* CBS 5585 com três (A), sete (B) e quinze (C) dias de incubação a 25 °C (primeira linha) e três (D), sete (E) e quinze (F) dias a 37 °C (segunda linha).

Figura 10: Comparação das características macromorfológicas apresentadas por cultivos de *T. inkin* (EPM 129CC/06) com três (A), sete (B) e quinze (C) dias de incubação a 25 °C (primeira linha) e três (D), sete (E) e quinze (F) dias a 37 °C (segunda linha).

Figura 11: Comparação das características macromorfológicas apresentadas por cultivos de *T. ovoides* CBS 7556 com três (A), sete (B) e quinze (C) dias de incubação a 25 °C (primeira linha) e três (D), sete (E) e quinze (F) dias a 37 °C (segunda linha).

5.3.1.2 Micromorfologia

Vinte e oito leveduras do gênero *Trichosporon* testadas. Blastoconídios, Pseudo-hifas e hifas verdadeiras foram observadas ao exame microscópico de todos os isolados. Artroconídios em forma de barril foram verificados em 60,7% (17/28) das leveduras, enquanto que cilíndricos em 39,3% (11/28), sendo 45,4% (5/11) alongados e 54,5% (6/11) curtos/elipsóides.

Trichosporon asahii (100% [13/13]) apresentaram artroconídios em forma de barril, assim como *T. mucoides* (100% [4/4]). No entanto, este último também expressou conídios latero-terminais em forma de clave em 75% (3/4) das amostras. Artroconídios cilíndricos mais alongados foram compatíveis com *T. inkin*. Já, *T. ovoides* foram caracterizados pela presença de artroconídios cilíndricos curtos e elipsóides. Não foram observadas células apressórias (Tabela 9 e Figura 12).

5.3.2 Testes bioquímicos empregados na caracterização das espécies de *Trichosporon*

5.3.2.1 Assimilação de fontes de carbono

Os resultados obtidos nos testes de assimilação de fontes de carbono encontram-se na Tabela 12.

5.3.2.2 Sensibilidade a ciclo-heximida

Das 28 amostras testadas, seis das semeadas em 25 °C e sete em 37 °C não apresentaram crescimento compatível com seus respectivos controles semeados em ASD. Entre essas amostras, apenas duas coincidiram (*T. asahii* [CBS2479] e *T. asahii* [ICB492/98]), ou seja, eram a mesma em ambas as temperaturas testadas (Tabela 10). Entre as amostras semeadas em 25 °C incluíam-se *T. asahii* (n=3) e *T. ovoides* (n=1). E, entre as amostras semeadas a 37 °C: *T. asahii* (n=2), *T. inkin* (n=1), *T. mucoides* (n=1) e *T. ovoides* (n=1) (Tabela 11).

Tabela 9. Características micromorfológicas de espécies de *Trichosporon* estudadas através de cultivo em lâmina com meio de ágar fubá acrescido de Tween 80 e incubadas a temperatura ambiente durante 24 horas.

Amostra	Característica									Espécie	
	Blasto conídio	Pseudo- hifa	Hifa	Artroconídio			Comídio lateral		Célula apressó ria		
				Barril	Cilíndrico		Simples	Clavado			
					Longo	Curto					Elipsoidal
CBS 2479	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
CBS 5585	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	<i>T. inkin</i>
CBS 7625	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>T. mucoides</i>
CBS 7556	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>T. ovoides</i>
UNIPAR 5	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>T. mucoides</i>
UNIPAR 11	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>T. ovoides</i>
UNIPAR 12	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>T. ovoides</i>
UNIP c 8(2)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
UNIP c 9(2)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
EPM 25pg	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	<i>T. inkin</i>
EPM 26pg	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	<i>T. inkin</i>
EPM 83up	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>T. ovoides</i>
EPM 130pp/06	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>T. ovoides</i>
ICB 439/98	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>T. mucoides</i>
ICB 45/99	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
EPM 51um/04	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	<i>T. inkin</i>

Continua...

Tabela 9. (Continuação)

Amostra	Característica									Espécie	
	Blasto - conídio	Pseudo- hifa	Hifa	Artroconídio			Comídio lateral		Célula apressó- ria		
				Barril	Cilíndrico		Simples	Clavado			
					Longo	Curto					Elipsoidal
ICB 86/03	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahiii</i>
ICB 492/98	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
ICB 598/98	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>T. mucoides</i>
ICB 679/98	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
UNIP t 01/08	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
UNIP t 17/08	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
UNIPAR 4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
UNIPAR 9	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	<i>T. inkin</i>
UNIPAR 16	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>T. ovoides</i>
UNIP c 5OD	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
UNIP c 13(4)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>
UNIP c 14(1)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>T. asahii</i>

T. = *Trichosporon*

EPM = Escola Paulista de Medicina

ICB = Instituto de Ciências Biomédicas

UNIVAP = Universidade do Vale do Paraíba

UNIP = Universidade Paulista

Figura 12. Características micromorfológicas de *Trichosporon* spp. em ágar Fubá-Tween 80. Blastoconídios, hifa, pseudo-hifas (A) e artroconídios em forma de barril (B) em isolado de *T. asahii* (400x); artroconídio cilíndricos e alongados (C) e pseudo-hifas com conídios laterais (D) compatíveis com *T. inkin* (1000x). Hifas com conídios laterais clavados (E) em *T. mucoides* (1000x); e artroconídios cilíndricos mais curtos (F) em *T. ovoides* (1000x).

Tabela 10. Medidas das colônias de *Trichosporon* spp. submetidas a crescimento em ASD, ASD + 0,1% de ciclo-heximida e ASD + 0,01% de ciclo-heximida, incubada sob diferentes temperaturas durante 72 horas.

Amostra	Espécie	Incubação											
		Dia 0						Dia 3					
		ASD		0,1%		0,01%		ASD		0,1%		0,01%	
		25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
CBS 2479	<i>T. asahii</i>	5	8	4	8	5	7	14	21	5	8	17	14
CBS 5585	<i>T. inkin</i>	6	6	6	8	5	6	24	22	54	22	30	77
CBS 7625	<i>T. mucoides</i>	6	9	6	8	7	9	14	19	30	83	19	28
CBS 7556	<i>T. ovoides</i>	7	6	7	7	8	10	35	20	17	30	28	38
UNIPAR 5	<i>T. mucoides</i>	8	7	7	9	8	5	17	74	55	73	40	67
UNIPAR 11	<i>T. ovoides</i>	7	7	9	5	8	7	12	18	60	85	32	85
UNIPAR 12	<i>T. ovoides</i>	7	6	7	9	7	7	14	7	35	85	48	85
UNIP c 8(2)	<i>T. asahii</i>	5	7	7	7	8	6	18	32	40	74	41	49
UNIP c 9(2)	<i>T. asahii</i>	5	8	5	8	7	8	22	34	15	32	32	29
EPM 25pg	<i>T. inkin</i>	6	6	6	6	7	7	24	85	46	85	68	75
EPM 26pg	<i>T. inkin</i>	6	7	6	6	6	6	18	22	24	22	18	19
EPM 83up	<i>T. ovoides</i>	5	6	6	7	6	6	13	85	20	85	53	85
EPM 130pp/06	<i>T. ovoides</i>	5	7	6	7	7	6	20	85	30	85	39	85
ICB 439/98	<i>T. mucoides</i>	7	7	6	5	7	8	17	85	24	85	28	98
ICB 45/99	<i>T. asahii</i>	6	7	6	5	7	6	23	19	18	15	29	20
EPM 51um/04	<i>T. inkin</i>	8	8	7	8	9	8	16	19	16	50	16	50
ICB 86/03	<i>T. asahii</i>	5	6	6	7	6	6	18	24	42	85	65	85
ICB 492/98	<i>T. asahii</i>	6	6	5	8	7	6	22	19	14	21	28	24

Continua...

Tabela 10. (Continuação)

Amostra	Espécie	Incubação											
		Dia 0						Dia 3					
		ASD		0,1%		0,01%		ASD		0,1%		0,01%	
		25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
ICB 598/98	<i>T. mucoides</i>	7	7	6	9	6	5	24	18	30	85	54	87
ICB 679/98	<i>T. asahii</i>	6	8	6	6	6	7	16	85	21	85	33	85
UNIP t 01/08	<i>T. asahii</i>	6	8	5	6	5	5	19	85	20	85	19	85
UNIP t 17/08	<i>T. asahii</i>	6	6	6	7	8	8	15	18	18	15	18	29
UNIPAR 4	<i>T. asahii</i>	6	8	6	6	6	7	16	85	21	85	33	85
UNIPAR 9	<i>T. inkin</i>	7	7	9	5	8	7	12	18	60	85	32	85
UNIPAR 16	<i>T. ovoides</i>	5	6	6	7	6	6	13	85	20	85	53	85
UNIP c 5OD	<i>T. asahii</i>	7	6	7	7	8	10	35	20	17	30	18	35
UNIP c 13(4)	<i>T. asahii</i>	8	7	7	9	8	5	17	74	55	73	40	67
UNIP c 14(1)	<i>T. asahii</i>	6	8	5	6	5	5	19	85	20	85	19	85

T. = *Trichosporon*

EPM = Escola Paulista de Medicina

ICB = Instituto de Ciências Biomédicas

UNIVAP = Universidade do Vale do Paraíba

UNIP = Universidade Paulista

Tabela 11. Proporção de crescimento (%) das colônias de *Trichosporon* spp. submetidas a crescimento em ASD, ASD + 0,1% de ciclo-heximida e ASD + 0,01% de ciclo-heximida, incubada sob diferentes temperaturas durante 72 horas.

Amostra	Espécie	Temperatura					
		25 °C			37 °C		
		ASD	0,01%	0,1%	ASD	0,01%	0,1%
CBS 2479	<i>T. asahii</i>	64,3	70,6	20,0	61,9	50,0	0,0
CBS 5585	<i>T. inkin</i>	75,0	83,3	88,9	72,7	92,2	63,6
CBS 7625	<i>T. mucoides</i>	57,1	63,2	80,0	52,6	67,9	90,4
CBS 7556	<i>T. ovoides</i>	80,0	71,4	58,8	70,0	73,7	76,7
UNIPAR 5	<i>T. mucoides</i>	52,9	80,0	87,3	90,5	92,5	87,7
UNIPAR 11	<i>T. ovoides</i>	41,7	75,0	85,0	61,1	91,8	94,1
UNIPAR 12	<i>T. ovoides</i>	50,0	85,4	80,0	14,3	91,8	89,4
UNIP c 8(2)	<i>T. asahii</i>	72,2	80,5	82,5	78,1	87,8	90,5
UNIP c 9(2)	<i>T. asahii</i>	77,3	78,1	66,7	76,5	72,4	75,0
EPM 25pg	<i>T. inkin</i>	75,0	89,7	87,0	92,9	90,7	92,9
EPM 26pg	<i>T. inkin</i>	66,7	66,7	75,0	68,2	68,4	72,7
EPM 83up	<i>T. ovoides</i>	61,5	88,7	70,0	92,9	92,9	91,8
EPM 130pp/06	<i>T. ovoides</i>	75,0	82,1	80,0	91,8	92,9	91,8
ICB 439/98	<i>T. mucoides</i>	58,8	75,0	75,0	91,8	91,8	94,1
ICB 45/99	<i>T. asahii</i>	73,9	75,9	66,7	63,2	70,0	66,7
EPM 51um/04	<i>T. inkin</i>	50,0	65,4	56,3	57,9	84,0	84,0
ICB 86/03	<i>T. asahiii</i>	72,2	90,8	85,7	75,0	92,9	91,8
ICB 492/98	<i>T. asahii</i>	72,7	75,0	64,3	68,4	75,0	61,9
ICB 598/98	<i>T. mucoides</i>	70,8	88,9	80,0	61,1	94,3	89,4

Continua...

Tabela 11 (Continuação)

Amostra	Espécie	Temperatura					
		25 °C			37 °C		
		ASD	0,01%	0,1%	ASD	0,01%	0,1%
ICB 679/98	<i>T. asahii</i>	62,5	81,8	71,4	90,6	91,8	92,9
UNIP t 01/08	<i>T. asahii</i>	68,4	73,7	75,0	90,6	94,1	92,9
UNIP t 17/08	<i>T. asahii</i>	60,0	71,4	66,7	66,7	72,4	53,3
UNIPAR 4	<i>T. asahii</i>	62,5	81,8	71,4	90,6	91,8	92,9
UNIPAR 9	<i>T. inkin</i>	41,7	75,0	85,0	61,1	91,8	94,1
UNIPAR 16	<i>T. ovoides</i>	61,5	88,7	70,0	92,9	92,9	91,8
UNIP c 5OD	<i>T. asahii</i>	82,9	86,2	58,8	70,0	71,4	76,7
UNIP c 13(4)	<i>T. asahii</i>	58,8	80,0	87,3	90,5	92,5	87,7
UNIP c 14(1)	<i>T. asahii</i>	68,4	73,7	75,0	90,6	94,1	92,9

T. = *Trichosporon*

EPM = Escola Paulista de Medicina

ICB = Instituto de Ciências Biomédicas

UNIVAP = Universidade do Vale do Paraíba

UNIP = Universidade Paulista

Tabela 12. Testes bioquímicos aplicados à identificação de amostras de *Trichosporon* (DE HOOG et al., 2000).

Amostras	Origem	Espécie	Fontes de carbono				37 °C	Ciclo-heximide (0,1%)	Célula Apressória
			L-Arabinose	Sorbitol	Melibiose	Mio-Inositol			
CBS 2479	Padrão	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	-	-
CBS 5585	Padrão	<i>T. inkin</i>	-	-	-	+	+	-	+
CBS 7625	Padrão	<i>T. mucoides</i>	+	+	+	+	+	+	-
CBS 7556	Padrão	<i>T. ovoides</i>	-	-	-	-	+	+	+
UNIPAR 5	Dermatite	<i>T. mucoides</i>	+	+	+	-	+	-	-
UNIPAR 11	Piedra branca	<i>T. ovoides</i>	+	-	-	-	+	+	-
UNIPAR 12	Piedra branca	<i>T. ovoides</i>	+	-	-	-	+	+	-
UNIP c 8(2)	Microbiota	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	+	-
UNIP c 9(2)	Microbiota	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	+	-
EPM 25pg	Microbiota	<i>T. inkin</i>	-	-	-	+	+	+	-
EPM 26pg	Microbiota	<i>T. inkin</i>	-	-	-	+	+	+	-
EPM 83up	Onicomucose	<i>T. ovoides</i>	+	-	-	-	+	+	-
EPM 130pp/06	Dermatite	<i>T. ovoides</i>	+	-	-	-	+	+	-
ICB 439/98	Trichosporonose	<i>T. mucoides</i>	+	+	+	-	+	+	-
ICB 45/99	Trichosporonose	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	+	-
EPM 51um/04	Onicomucose	<i>T. inkin</i>	-	-	-	+	+	+	-
ICB 86/03	Trichosporonose	<i>T. asahiii</i>	+	-	-	-	+	+	-
ICB 492/98	Trichosporonose	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	-	-
ICB 598/98	Trichosporonose	<i>T. mucoides</i>	+	+	+	-	+	+	-
ICB 679/98	Trichosporonose	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	+	-

Continua...

Tabela 12. (Continuação)

Amostras	Origem	Espécie	Fontes de carbono				37 °C	Ciclo-heximide (0,1%)	Célula Apressória
			L-Arabinose	Sorbitol	Melibiose	Myo-Inositol			
UNIP t 01/08	Microbiota	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	+	-
UNIP t 17/08	Microbiota	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	-	-
UNIPAR 4	Trichosporonose	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	+	-
UNIPAR 9	Piedra branca	<i>T. inkin</i>	-	-	-	+	+	+	-
UNIPAR 16	Piedra branca	<i>T. ovoides</i>	+	-	-	-	+	-	-
UNIP c 5OD	Microbiota	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	+	-
UNIP c 13(4)	Microbiota	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	-	-
UNIP c 14(1)	Microbiota	<i>T. asahii</i>	+	-	-	-	+	+	-

T. = *Trichosporon*

EPM = Escola Paulista de Medicina

ICB = Instituto de Ciências Biomédicas

UNIVAP = Universidade do Vale do Paraíba

UNIP = Universidade Paulista

5.4 Comportamento cromogênico do gênero *Trichosporon* em CHROMagar Candida®

De maneira geral, cultivos de *Trichosporon* sp evidenciaram coloração verde-azulada, tonalidades de lilás, e zona marginal não pigmentada. Os isolados amostra-padrão e ICB 86/03, identificados como *T. asahii* revelaram colônias azuis com centro lilás e colônias lilás e centro verde, após 72 horas de incubação. Amostra padrão de *T. inkin* (CBS 5585) expressou colônias azuis com centro verde. Os isolados de *T. mucoides* (CBS 7625) exibiram colônias que variavam de azul a lilás com centro verde. Cultivos de *T. ovoides* (CBS 7556) demonstraram coloração azulada da colônia. O comportamento cromogênico de *Trichosporon* spp. pode ser visualizado na Figura 13.

5.5 Identificação semi-automatizada (ID 32 C®)

Das 28 amostras testadas, aproximadamente 9% (8/28) foram identificadas através do kit comercial (ID 32 C Biomerieux®). Os isolados restantes, 91% (26/28), não foram caracterizados, prevalecendo perfil inaceitável da codificação numérica obtida. A relação de amostras aplicadas na identificação através de sistema semi-automatizado está disponível na Tabela 13.

Figura 13. Comportamento cromogênico de amostras de *Trichosporon* spp. em meio de CHROMagar Candida®. Nota-se variação no padrão de coloração tanto da colônia quanto do pigmento difuso no meio de cultura entre dois isolados de *T. asahii* CBS 2479 (A) e amostra clínica previamente identificada como *T. asahii* (B). Zonas marginais não pigmentadas em dois isolados de *Trichosporon* sp (C e D). Colônia violácea com pigmento esverdeado difuso em *T. inkin* CBS 5585 (E), e centro verde e nuances lilás em *T. ovoides* (CBS 7556) (F).

Tabela 13. Resultados obtidos na identificação das amostras de *Trichosporon* spp. através da aplicação de kit semi-automatizado ID 32 C (Biomerieux®, Marcy-l'Etoile, França). Leitura em 72 horas.

Amostras	Espécies	Acurácia (%)	Perfil
CBS 2479 (<i>T. asahii</i>)	<i>T. asahii</i>	73,1	Duvidoso
CBS 5585 (<i>T. inkin</i>)	<i>N.I.</i> *	-	Inaceitável
CBS 7625 (<i>T. mucoides</i>)	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
CBS 7556 (<i>T. ovoides</i>)	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIPAR 5	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIPAR 11	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIPAR 12	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIP c 8(2)	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIP c 9(2)	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
EPM 25	<i>T. mucoides</i>	15,1	Duvidoso
EPM 26	<i>T. inkin</i>	50,3	Bom para gênero
EPM 83up	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
EPM 130pp/06	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
ICB 439/98	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
ICB 45/99	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
EPM 51um/04	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
ICB 86/03	<i>T. asahii.</i>	95,6%	Aceitável
ICB 492/98	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
ICB 598/98	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
ICB 679/98	<i>T. mucoides</i>	82,7	Fraca discriminação
UNIP t 01/08	<i>T. mucoides</i>	89,0	Aceitável
UNIP t 17/08	<i>T. asahii</i>	99,9	Excelente
UNIPAR 4	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIPAR 9	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIPAR 16	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIP c 5OD	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIP c 13(4)	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável
UNIP c 14(1)	<i>N.I.</i>	-	Inaceitável

* *N.I.* = não identificada; *T.* = *Trichosporon*

5.6 Pesquisa dos fatores associados à virulência

5.6.1 Detecção da produção de enzimas extracelulares

5.6.1.1 Atividade de proteinases

Dos 28 isolados testados para produção de proteinase, incluindo as quatro amostras-padrão, 46,4% (13/28) apresentaram atividade enzimática positiva (Figura 14). Das 13 amostras positivas, 23,1% (3/13) apresentaram valores de Pz menores do que 0,64 indicando atividade enzimática de proteinases, fortemente positiva.

Os isolados de *T. asahii* (13), *T. inkin* (5), *T. mucoides* (4) e *T. ovoides* (6) também apresentaram atividade enzimática positiva - sete (53,8%) amostras de *T. asahii*; três (60%) de *T. inkin*; duas (50%) de *T. mucoides*; e uma (16,7%) de *T. ovoides*. Atividade fortemente positiva foi detectada em apenas dois (28,6%) *T. asahii*. Enquanto que o único isolado de *T. ovoides* que apresentou atividade enzimática, também foi o que apresentou atividade fortemente positiva (Tabela 14).

O maior número de amostras (46,4% [13/28]) que expressaram a atividade enzimática, foi verificado com 72 horas de leitura. O mesmo foi observado para cada espécie em separado.

Figura 14. Amostras de *Trichosporon* spp. testadas para produção de proteinase. Amostra de *C. albicans* (ICB 12A) expressando atividade positiva (A), *T. asahii* (ICB439/98) não produtora (B) e amostra de *T. inkin* (CBS 5585) com atividade de proteinase detectada (C).

5.6.1.2 Atividade de fosfolipases

Em geral, pouco mais da metade (57,1% [16/28]) das amostras de *Trichosporon* expressaram atividade de fosfolipase, sendo que em 31,2% (5/16) dos casos ela foi considerada fortemente positiva (Figura 15A).

O percentual de positividade para cada espécie foi de: *T. asahii* (46,1% [6/13]), *T. inkin* (60% [3/5]), *T. mucoides* (75% [3/4]) e *T. ovoides* (66,7% [4/6]). A atividade enzimática fortemente positiva foi detectada em todas as espécies, sendo que o valor (33,3%) foi, proporcionalmente, o mesmo para *T. asahii*, *T. inkin* e *T. mucoides*. Já, para *T. ovoides* a frequência foi igual a 25%.

Nesse caso, o maior número de amostras (57,1% [16/28]) que expressaram a atividade enzimática, foi verificado com cinco dias de leitura. No entanto, quando analisadas em separado, as diferentes espécies de *Trichosporon* apresentaram comportamento variado. *T. asahii* (6/13) e *T. ovoides* (4/6) expressaram atividade enzimática, predominantemente, ao dia 5 de leitura, enquanto *T. inkin* (3/5) e *T. mucoides* (3/4), com 72 horas de incubação (Tabela 15).

5.6.1.3 Atividade de lipases

A maior parte das amostras (92,8% [26/28]) de *Trichosporon* expressou atividade enzimática para lipases (Figuras 15B e 15C). Destes 26 casos, 13 (50%) foram considerados fortemente positivos.

Todos os isolados de *T. asahii* (13/13) e *T. ovoides* (6/6) expressaram atividade positiva, enquanto para *T. inkin* e *T. mucoides* a atividade enzimática foi notada em 80% (4/5) e 75% (3/4), respectivamente. O percentual de amostras fortemente positivas para cada uma das espécies foi: *T. asahii* = 38,5% (5/13), *T. inkin* = 50% (2/4), *T. mucoides* = 33,3% (3/4) e *T. ovoides* (66,7%) (Tabela 16).

Vinte e seis (92, 8%) amostras expressaram atividade enzimática de lipase no dia 5 de leitura. Esse período correspondeu ao número mais expressivo de amostras com atividade enzimática positiva. O mesmo foi observado para cada espécie em separado: *T. asahii* = 13; *T. inkin* = 4; *T. mucoides* = 3; e *T. ovoides* = 6.

5.6.1.4 Atividade de DNases

Aproximadamente 28% (8/28) das leveduras do gênero *Trichosporon* testadas foram positivas. Do total de isolados positivos (oito), 62,5% apresentaram atividade fortemente positiva (Figuras 15D, 15E e 15F).

Trichosporon asahii foi positivo em 30,8% (4/13) dos casos; *T. inkin*, 40% e *T. ovoides*, 50%. Esses mesmos isolados apresentaram atividade enzimática fortemente positiva, sendo 50% (2/4), 100% (2/2) e 33,3% (1/3), respectivamente. Nenhum dos isolados de *T. mucoides* apresentou atividade enzimática de DNase (Tabela 17).

A atividade de DNase foi mais expressiva no dia 7 de leitura, quando foi possível detectar o maior número de amostras capaz de expressar atividade enzimática (7/28). Quando analisadas em separado, as espécies demonstraram comportamentos diferentes: *T. asahii* (3/13) ao dia 7 de leitura, enquanto que para *T. inkin* (2/5) e *T. ovoides* (2/6), o dia 5.

Figura 15. Produção de enzimas extracelulares por *Trichosporon* spp. Verifica-se halo de degradação por fosfolipase (A); amostras negativa (B) e positiva (C) para lipase; ausência de halo de degradação por DNase (D) e outras duas amostras produtoras de DNase (E e F).

Tabela 14. Atividade enzimática de proteinase em 24 amostras de *Trichosporon* spp. e quatro amostras-padrão observadas em leituras de 24h, 48h, 72h, cinco, sete e 15 dias; código de atividade enzimática estabelecido segundo Ruchel et al., 1982.

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Ano de isolamento	Espécie	Atividade Enzimática (Pz)*					
					24h	48h	72h	5 dias	7 dias	15 dias
CBS 2479	Padrão	-	-	<i>T. asahii</i>	1,00	0,95	0,82	0,83	0,83	0,97
CBS 5585	Padrão	-	-	<i>T. inkin</i>	1,00	0,87	0,64	0,69	0,69	0,71
CBS 7625	Padrão	-	-	<i>T. mucoides</i>	1,00	0,80	0,75	0,77	0,79	0,78
CBS 7556	Padrão	-	-	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 5	Dermatite	Pele da face	2002	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 11	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 12	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovóides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 8(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 9(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	0,87	0,86	0,86	0,85
EPM 25pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	1,00	0,90	0,73	0,75	0,76	0,83
EPM 26pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EPM 83up	Onicomicose	Unha do pé	2005	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EPM 130pp/06	Dermatite	Pele do pé	2006	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	0,62	0,60	0,64	0,75
ICB 439/98	Trichosporonose	Sangue	1998	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ICB 45/99	Trichosporonose	Sangue	1999	<i>T. asahii</i>	1,00	0,83	0,60	0,50	0,70	0,80
EPM 51um/04	Onicomicose	Unha da mão	2004	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	0,96	0,90	0,84	0,88
ICB 86/03	Trichosporonose	Sangue	2003	<i>T. asahiii</i>	1,00	1,00	0,61	0,76	0,87	0,78
ICB 492/98	Trichosporonose	Cateter	1998	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	0,87	0,87	0,91	0,92
ICB 598/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	0,89	0,69	0,69	0,77

Continua...

Tabela 14. (Continuação)

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Ano de isolamento	Espécie	Atividade Enzimática (Pz)*					
					24h	48h	72h	5 dias	7 dias	15 dias
ICB 679/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. asahii</i>	1,00	0,79	0,75	0,67	0,67	0,67
UNIP t 01/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,89	0,90	0,91	0,91	0,92
UNIP t 17/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 4	Trichosporonose	Escarro	2001	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 9	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 16	Piedra branca	Cabelo	2005	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 5OD	Microbiota	Conduto auditivo	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 13(4)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 14(1)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

* Pz = 1,0 – negativa; $Pz \geq 0,64$ e $< 1,0$ – positiva e $Pz < 0,64$ – fortemente positiva

Tabela 15. Atividade enzimática de fosfolipase em 24 amostras de *Trichosporon* spp. e quatro amostras-padrão observadas em leituras de 24h, 48h, 72h, cinco, sete e 15 dias; código de atividade enzimática estabelecido segundo Price et al., 1982.

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Ano de isolamento	Espécie	Atividade Enzimática (Pz)*					
					24h	48h	72h	5 dias	7 dias	15 dias
CBS 2479	Padrão	-	-	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
CBS 5585	Padrão	-	-	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
CBS 7625	Padrão	-	-	<i>T. mucoides</i>	1,00	0,54	0,50	0,58	0,67	0,75
CBS 7556	Padrão	-	-	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 5	Dermatite	Pele da face	2002	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	0,87	0,89	0,85	0,84
UNIPAR 11	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovoides</i>	1,00	0,58	0,83	0,84	0,80	0,80
UNIPAR 12	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	0,65	0,87	0,87	1,00
UNIP c 8(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	0,50	0,49	1,00
UNIP c 9(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	0,73	0,60	0,60	1,00
EPM 25pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	0,83	0,85	0,86	1,00
EPM 26pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EPM 83up	Onicomicose	Unha do pé	2005	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EPM 130pp/06	Dermatite	Pele do pé	2006	<i>T. ovoides</i>	1,00	0,87	0,87	0,70	0,70	0,70
ICB 439/98	Trichosporonose	Sangue	1998	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ICB 45/99	Trichosporonose	Sangue	1999	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EPM 51um/04	Onicomicose	Unha da mão	2004	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	0,54	0,60	0,60	0,60
ICB 86/03	Trichosporonose	Sangue	2003	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	0,75	0,71	0,73	0,80
ICB 492/98	Trichosporonose	Cateter	1998	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ICB 598/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. mucoides</i>	1,00	0,73	0,71	0,73	0,73	0,75

Continua...

Tabela 15. (Continuação)

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Ano de isolamento	Espécie	Atividade Enzimática (Pz)*					
					24h	48h	72h	5 dias	7 dias	15 dias
ICB 679/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. asahii</i>	1,00	0,83	0,64	0,67	0,75	0,77
UNIP t 01/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP t 17/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 4	Trichosporonose	Escarro	2001	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	0,72	0,84	0,80	0,75
UNIPAR 9	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	0,75	0,83	0,80	1,00
UNIPAR 16	Piedra branca	Cabelo	2005	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	0,92	0,92	0,92
UNIP c 5OD	Microbiota	Conduto auditivo	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	0,82	0,85	0,85
UNIP c 13(4)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 14(1)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

* Pz = 1,0 – negativa; $Pz \geq 0,64$ e $< 1,0$ – positiva e $Pz < 0,64$ – fortemente positiva

Tabela 16. Atividade enzimática de lipase em 24 amostras de *Trichosporon* spp. e quatro amostras-padrão observadas em leituras de 24h, 48h, 72h, cinco, sete e 15 dias; código de atividade enzimática estabelecido segundo Mushin et al., 1997.

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Ano de isolamento	Espécie	Atividade Enzimática (Pz)*					
					24h	48h	72h	5 dias	7 dias	15 dias
CBS 2479	Padrão	-	-	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	0,89	0,69	0,60	0,60
CBS 5585	Padrão	-	-	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	0,67	0,60	0,60
CBS 7625	Padrão	-	-	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	0,68	0,72	0,71	0,71
CBS 7556	Padrão	-	-	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	0,74	0,78	1,00	1,00
UNIPAR 5	Dermatite	Pele da face	2002	<i>T. mucoides</i>	1,00	0,42	0,50	0,52	0,52	0,52
UNIPAR 11	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovoides</i>	1,00	0,60	0,31	0,29	0,29	0,29
UNIPAR 12	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovoides</i>	1,00	0,47	0,44	0,39	0,39	0,39
UNIP c 8(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,65	0,76	0,68	0,68	0,68
UNIP c 9(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,82	0,75	0,76	0,76	0,76
EPM 25pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	0,96	0,88	0,86	0,86
EPM 26pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EPM 83up	Onicomicose	Unha do pé	2005	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	0,71	0,65	0,65
EPM 130pp/06	Dermatite	Pele do pé	2006	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	0,83	0,71	0,59	0,59
ICB 439/98	Trichosporonose	Sangue	1998	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ICB 45/99	Trichosporonose	Sangue	1999	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	0,64	0,69	0,69
EPM 51um/04	Onicomicose	Unha da mão	2004	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	0,90	0,71	0,66	0,66
ICB 86/03	Trichosporonose	Sangue	2003	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	0,94	0,82	0,90	0,90
ICB 492/98	Trichosporonose	Cateter	1998	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	0,90	0,82	0,86	0,86
ICB 598/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	1,00	0,90	0,93	0,93

Continua...

Tabela 16. (Continuação)

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Ano de isolamento	Espécie	Atividade Enzimática (Pz)*					
					24h	48h	72h	5 dias	7 dias	15 dias
ICB 679/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	0,76	0,71	0,65	0,65
UNIP t 01/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,92	0,75	0,74	0,96	0,96
UNIP t 17/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,61	0,65	0,47	0,47	0,47
UNIPAR 4	Trichosporonose	Escarro	2001	<i>T. asahii</i>	1,00	0,61	0,46	0,50	0,50	0,50
UNIPAR 9	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. inkin</i>	1,00	0,64	0,42	0,32	0,32	0,32
UNIPAR 16	Piedra branca	Cabelo	2005	<i>T. ovoides</i>	1,00	0,50	0,16	0,41	0,41	0,41
UNIP c 5OD	Microbiota	Conduto auditivo	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,65	0,61	0,54	0,54	0,54
UNIP c 13(4)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,57	0,81	0,81	0,81	0,81
UNIP c 14(1)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,57	0,78	0,75	0,75	0,75

* Pz = 1,0 – negativa; Pz ≥ 0,64 e < 1,0 – positiva e Pz < 0,64 – fortemente positiva

Tabela 17. Atividade enzimática de DNase em 24 amostras de *Trichosporon* spp. e quatro amostras-padrão observadas em leituras de 24h, 48h, 72h, cinco, sete e 15 dias; código de atividade enzimática estabelecido segundo Lopez-Martinez et al., 1994.

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Ano de isolamento	Espécie	Atividade Enzimática (Pz)*					
					24h	48h	72h	5 dias	7 dias	15 dias
CBS 2479	Padrão	-	-	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	0,80	0,78	0,78
CBS 5585	Padrão	-	-	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	0,64	0,58	0,57	0,64
CBS 7625	Padrão	-	-	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
CBS 7556	Padrão	-	-	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 5	Dermatite	Pele da face	2002	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 11	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	0,82	1,00	1,00
UNIPAR 12	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 8(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 9(2)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EPM 25pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EPM 26pg	Microbiota	Genital	2007	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EPM 83up	Onicomicose	Unha do pé	2005	<i>T. ovoides</i>	1,00	0,87	0,89	0,47	0,45	0,54
EPM 130pp/06	Dermatite	Pele do pé	2006	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	0,87	0,87
ICB 439/98	Trichosporonose	Sangue	1998	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ICB 45/99	Trichosporonose	Sangue	1999	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	0,83
EPM 51um/04	Onicomicose	Unha da mão	2004	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	0,59	0,46	0,43
ICB 86/03	Trichosporonose	Sangue	2003	<i>T. asahiii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ICB 492/98	Trichosporonose	Cateter	1998	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ICB 598/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. mucoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Continua...

Tabela 17. (Continuação)

Amostras	Origem	Sítio de isolamento	Ano de isolamento	Espécie	Atividade Enzimática (Pz)*					
					24h	48h	72h	5 dias	7 dias	15 dias
ICB 679/98	Trichosporonose	Urina	1998	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP t 01/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP t 17/08	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,45	0,65	0,67	0,67	0,70
UNIPAR 4	Trichosporonose	Escarro	2001	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 9	Piedra branca	Cabelo	2004	<i>T. inkin</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIPAR 16	Piedra branca	Cabelo	2005	<i>T. ovoides</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 5OD	Microbiota	Conduto auditivo	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 13(4)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UNIP c 14(1)	Microbiota	Pelame	2007	<i>T. asahii</i>	1,00	0,58	1,00	1,00	1,00	1,00

* Pz = 1,0 – negativa; $Pz \geq 0,64$ e $< 1,0$ – positiva e $Pz < 0,64$ – fortemente positiva

5.6.2 Detecção de melanina

5.6.2.1 Melanização das células de *T. asahii*

Não se observou enegrecimento do cultivo de *T. asahii* (CBS 2479) e apenas discreto escurecimento de cultivo de *T. asahii* (ICB 86/03). Amostras de *Cryptococcus neoformans* (ICB 162C) e *Candida albicans* (ICB 12A) foram empregadas como controles positivo e negativo, respectivamente (Figura 16).

5.6.2.2 Atividade da lacase

Os valores de absorbância para todas as amostras são representados na Tabela 18.

Tabela 18. Atividade da enzima lacase segundo os valores de absorbância apresentados pelos cultivos mantidos na presença e ausência de L-DOPA.

Amostra	L-DOPA*	Absorbância
<i>C. albicans</i> (ICB 12A)	-	0,0272
<i>C. albicans</i> (ICB 12A)	+	0,0336
<i>C. neoformans</i> (ICB 162C)	-	0,0684
<i>C. neoformans</i> (ICB 162C)	+	0,1795
<i>T. asahii</i> (CBS 2479)	-	0,0108
<i>T. asahii</i> (CBS 2479)	+	0,0180
<i>T. asahii</i> (ICB86/03)	-	0,1034
<i>T. asahii</i> (ICB 86/03)	+	0,1244

* Presença de L-DOPA (+), Ausência de L-DOPA (-)

5.6.3 Detecção de GXM em parede celular de *Trichosporon asahii*

5.6.3.1 Imunofluorescência direta

O resultado do teste de imunofluorescência direta aplicado na verificação da presença do antígeno polissacarídico glucuronoxilomanana (GXM) pode ser observado na Figura 17.

Figura 16. Expressão de melanina em parede celular. Comparação entre a parede celular de amostra positiva de *Cryptococcus neoformans* (ICB 162C) (A) e amostra negativa de *Trichosporon asahii* (ICB 86/03) (B). Microscopia eletrônica de transmissão, 20.000x.

5.7 Teste de sensibilidade a antifúngicos (E-test®)

De maneira geral, as diversas espécies de *Trichosporon* apresentaram valores de CIM entre 0,016-16μg/mL para anfotericina B; 0,125-64μg/mL para fluconazol; 0,032-8μg/mL para itraconazol; 0,032-6μg/mL para cetoconazol; 0,023-4μg/mL para voriconazol e 12-24μg/mL para caspofungina (Figura 18).

Anfoterina B apresentou valores de CIM iguais a: 0,023-3μg/mL para *T. asahii*; 0,016-3μg/mL para *T. inkin*; 0,25-0,5μg/mL para *T. mucoides*; e 0,032-16μg/mL para *T. ovoides* (Figura 19).

Fluconazol expressou valores de CIM máximos e mínimos iguais a: 0,24-32μg/mL para *T. asahii*; 0,125-32μg/mL para *T. inkin*, sendo que uma amostra (1/5 [20%]) não apresentou formação de elipse de inibição. *Trichosporon mucoides* não apresentou formação de elipse de inibição em 100% (4/4) dos casos; enquanto que para *T. ovoides* o CIM foi igual a 1,5-64μg/mL (Figura 20).

Trichosporon asahii expressaram CIM para itraconazol localizados entre 0,047-1μg/mL e *T. inkin*, 0,32-4μg/mL. Já, nos cultivos de *T. mucoides* não foi verificada formação de elipse de

inibição em 75% (3/4) dos casos. A única amostra que demonstrou sensibilidade, apresentou CIM igual a 0,75µg/mL. Para *T. ovoides*, os valores de CIM foram de 0,032-8µg/mL (Figura 21).

Cetoconazol apresentou CIM entre 0,032-6µg/mL para *T. asahii* e 0,25-3µg/mL para *T. inkin*. *Trichosporon mucoides* foi resistente em 75% (3/4) das amostras. Para *T. ovoides* os valores verificados foram de 0,09-2µg/mL (Figura 22).

Os valores de CIM mínimos e máximos para voriconazol foram representados por 0,047-1µg/mL para *T. asahii*; 0,038-1µg/mL para *T. inkin* e 0,023-0,75µg/mL para *T. ovoides*. Metade das amostras (2/4) de *T. mucoides* foram resistentes. A outra metade expressou sensibilidade a CIM entre 0,25-4µg/mL (Figura 23).

Todos os isolados de *T. asahii* (13), *T. inkin* (5) e *T. ovoides* (6) foram resistentes a caspofungina. Vinte e cinco por cento (1/4) das amostras de *T. mucoides* também apresentaram resistência. A parcela de isolados de *T. mucoides* sensível a caspofungina expressou CIMs iguais a 12-24µg/mL (Figura 24).

Os valores de CIM de cada amostra podem ser observados na Tabela 19.

Figura 17. Detecção da expressão de antígeno polissacarídico glucuronoxilomana (GXM) em parede celular de *Trichosporon asahii* em campo claro (linha superior) e em campo escuro (linha inferior). A - *Candida albicans* ICB 12A (conrole negativo); B - *Cryptococcus neoformans* ICB 162C (conrole positivo); C - *Trichosporon asahii* CBS 2479) (amostra-padrão) e D - *Trichosporon asahii* (ICB 86/03) (amostra testada).

Tabela 19. Valores de MIC (Concentração Inibitória Mínima) em microgramas por mililitro em 28 amostras de *Trichosporon* estudadas pela técnica da fita de difusão E-test®.

Amostra	Espécie	Antifúngicos					
		AB	FL	IT	CT	VC	CS
UNIP c 9(2)	<i>T. asahii</i>	0,023	0,24	0,047	0,032	0,047	R
ICB 86/03	<i>T. asahiii</i>	0,023	2	0,064	0,064	0,064	R
ICB 679/98	<i>T. asahii</i>	0,032	2	0,064	0,25	0,094	R
UNIP c 14(1)	<i>T. asahii</i>	0,032	3	0,25	0,25	0,094	R
UNIP c 8(2)	<i>T. asahii</i>	0,064	4	0,25	0,25	0,125	R
ICB 45/99	<i>T. asahii</i>	0,064	4	0,25	0,25	0,19	R
UNIP c 13(4)	<i>T. asahii</i>	0,125	4	0,75	0,38	0,19	R
ICB 492/98	<i>T. asahii</i>	0,25	6	1	0,75	0,19	R
UNIP t 01/08	<i>T. asahii</i>	0,38	24	1	1	0,19	R
UNIPAR 4	<i>T. asahii</i>	0,38	24	1	1	0,25	R
UNIP c 5OD	<i>T. asahii</i>	1	32	1	3	0,38	R
UNIP t 17/08	<i>T. asahii</i>	1,5	R	R	6	1	R
CBS 2479	<i>T. asahii</i>	3	6	0,38	0,25	0,047	R
EPM 26pg	<i>T. inkin</i>	0,016	0,125	0,32	0,25	0,038	R
EPM 25pg	<i>T. inkin</i>	0,32	2	0,38	0,25	0,064	R
UNIPAR 9	<i>T. inkin</i>	0,38	24	0,38	1	0,064	R
CBS 5585	<i>T. inkin</i>	0,75	32	1,5	1	0,19	R
EPM 51um/04	<i>T. inkin</i>	3	R	4	3	1	R
UNIPAR 5	<i>T. mucoides</i>	0,25	R	0,75	1,5	0,25	12
CBS 7625	<i>T. mucoides</i>	0,38	R	R	R	4	16
ICB 439/98	<i>T. mucoides</i>	0,38	R	R	R	R	24
ICB 598/98	<i>T. mucoides</i>	0,5	R	R	R	R	R
CBS 7556	<i>T. ovoides</i>	0,032	1,5	0,032	0,09	0,023	R
UNIPAR 12	<i>T. ovoides</i>	0,064	2	0,38	0,25	0,023	R
UNIPAR 16	<i>T. ovoides</i>	0,064	4	0,38	0,38	0,064	R
EPM 83up	<i>T. ovoides</i>	0,094	4	0,75	0,38	0,064	R
EPM 130pp/06	<i>T. ovoides</i>	1	48	6	0,75	0,125	R
UNIPAR 11	<i>T. ovoides</i>	16	64	8	2	0,75	R

AB=Anfotericina B, FL=Fluconazol, IT=Itraconazol, CT=Cetoconazol, VC=Voriconazol, CS=Caspofungina, R = Resistência (nenhuma inibição).

Figura 18. Testes de suscetibilidade a antifúngicos (E-test[®]) para amostras de *Trichosporon* spp. A – Amostra de *T. asahii* X anfotericina B (CIM = 0,125µg/mL); B – *T. inkin* X fluconazol (CIM = 3µg/mL); C – *T. asahii* X itraconazol (CIM = 0,032µg/mL); D – *T. asahii* X cetoconazol (CIM = 0,38µg/mL); E – *T. inkin* X voriconazol (CIM = 3µg/mL); e F – *T. mucoides* X caspofungina (Resistente).

Figura 19. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de anfotericina B para diferentes espécies de *Tichosporon*.

Figura 20. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de fluconazol para *T. asahii*, *T. inkin* e *T. ovoides*.

Figura 21. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de itraconazol para *T. asahii*, *T. inkin* e *T. ovoides*.

Figura 22. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de cetoconazol para *T. asahii*, *T. inkin* e *T. ovoides*.

Figura 23. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de voriconazol para *T. asahii*, *T. inkin* e *T. ovoides*.

Figura 24. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) de caspofungina para *T. mucoides*.

6 DISCUSSÃO

As leveduras do gênero *Trichosporon* habitam nichos ecológicos naturais diversificados, podendo ser encontrados tanto no meio ambiente, como na superfície corpórea de seres humanos e animais (PAULA et al., 1983; MARTINS et al., 1989).

A colonização por *Trichosporon* ocorre mais comumente nas mucosas, região perigenital e cabelo, na sua grande maioria de maneira assintomática (ELLNER et al., 1993). O fungo já foi isolado até mesmo de roupas íntimas (ELLNER et al., 1990), fortalecendo a idéia de que o microclima estabelecido, principalmente na região inguinal, favoreça a colonização humana (COX; PERFECT, 1999). A identificação de agentes micóticos de lesões superficiais tanto de seres humanos quanto animais e o controle do tratamento podem ser efetivamente realizados através do método do quadrado de carpete (MARIAT; ADAM-CAMPOS, 1967), empregado nessa investigação (MARIAT; ADAM-CAMPOS, 1967; BENTUBO et al., 2006).

A técnica foi usada para a pesquisa e isolamento de leveduras do gênero *Trichosporon* da região genital de 83 pacientes com idades entre 15 e 87 anos, atendidos pelo ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo. *Trichosporon inkin* foi identificado em dois pacientes, representando prevalência de 5,3% sobre essa população e 4,6% dentre o número total de isolados leveduriformes obtidos na investigação. Os nossos achados concordam com aqueles obtidos por Mayser et al. (1996) que demonstram que espécies de *Trichosporon* podem representar cerca de 4,8% entre todas as leveduras isoladas da superfície do corpo de seres humanos saudáveis.

Vale ressaltar que a importância da relação que existe entre a colonização superficial e a infecção é pouco explorada (SUGITA et al., 1995). Por isso, a pesquisa de *Trichosporon* spp. na região inguinal tem sido realizada, principalmente, com o intuito de se detectar a presença de sinais da doença superficial: piedra branca, especialmente em homens, nos quais se acredita a doença ser prevalente (STENDERUP et al., 1986; HERBRECHT et al., 1993).

Trérizol-Ferly et al. (1994), realizaram estudo sobre a frequência de piedra branca numa população de 449 mulheres africanas entre 15 e 60 anos de idade. Foram tomadas amostras de pêlos pubianos e pele da região perigenital, submetidas a exame direto e cultura. Os autores verificaram 18% de prevalência de piedra branca inguinal nessa população, com predominância entre as jovens (14-44 anos de idade). Embora não tenha sido objetivo deste trabalho verificar a

freqüência de piedra branca inguinal nessa população, dois isolamentos de *T. inkin* foram obtidos de amostras clínicas da região perigenital de duas mulheres e nenhum homem. As idades dessas pacientes foram superiores (38 e 73 anos, respectivamente) àquelas observadas na população africana. A prevalência de indivíduos do sexo feminino na população poderia justificar a freqüência elevada de isolamento de *Trichosporon* sp em mulheres, nessa investigação. Após o isolamento, não foram obtidos pêlos das pacientes para que fosse possível confirmar a ocorrência de piedra branca genital ou determinar se o isolamento simplesmente representava a colonização da pele. Esses achados constituem dados epidemiológicos relevantes que necessitam ser melhor investigados.

Além de *Trichosporon*, outras leveduras também foram isoladas da microbiota da região perigenital dos 83 pacientes investigados: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. albicans*, *R. mucilaginosa* e *R. glutinis*. Os isolados obtidos nesse trabalho correspondem àqueles encontrados por outros autores em casos de infecção superficial (CROCCO et al., 2004; FERRAZZA et al., 2005; ABIA-BASSEY; UTSALO, 2006).

Entre as leveduras do gênero *Candida*, as espécies não-*albicans* corresponderam a 70,2% dos isolados sendo *Candida parapsilosis* a espécie não-*albicans* mais isolada dos pacientes estudados. Segundo Moreira (2005), a colonização por essa espécie ocorre no indivíduo recém-nascido, porém, numa fase mais tardia do que aquela observada no caso da *C. albicans*. Desse modo, a transmissão horizontal (pessoa-pessoa) é reconhecida como a principal via de colonização por *C. parapsilosis*, enquanto a transmissão vertical (mãe-filho) está mais relacionada à *C. albicans*, encontrada mais precocemente na microbiota do recém-nascido (MOREIRA, 2005). Alterações no equilíbrio estabelecido entre os microrganismos que compõem a microbiota, assim como, o emprego de antibióticos de amplo-espectro predispõe o hospedeiro à prevalência por um agente colonizador específico. No Brasil, ao contrário do que ocorre na América do Norte e Europa, *C. parapsilosis* é apontada como responsável pela vasta maioria de infecções por *Candida* não-*albicans*. (MOREIRA, 2005; PASQUALOTTO et al., 2006).

Cerca de 28% dos isolados desse trabalho, foram leveduras não-*Candida*. Neste grupo incluem-se *Rhodotorula mucilaginosa* (13,5%) e *R. glutinis* (12,2%), leveduras que atualmente são também consideradas patógenos fúngicos emergentes e oportunistas para pacientes imunodeprimidos (ZAAS et al., 2003; LUNARDI et al., 2006).

A microbiota superficial dos mamíferos é composta por ampla variedade de agentes fúngicos (bolores e leveduras) que podem, eventualmente, se tornarem patogênicos para seus hospedeiros. Em virtude da importância que as dermatofitoses representam na Medicina Veterinária, os fungos filamentosos têm sido mais estudados e gêneros de fungos filamentosos sapróbios, geralmente não patogênicos também têm sido relatados como integrantes da microbiota superficial dos animais domésticos, enquanto as leveduras, na maior parte dos casos, têm sido ignoradas.

Leveduras de interesse médico, como espécies de *Trichosporon*, não foram identificadas em qualquer um dos 21 cães sadios pesquisados neste trabalho. No entanto, outros pesquisadores já identificaram a presença desse fungo em cães. Gambale et al. (1987) obtiveram frequência de 0,9% no isolamento de *Trichosporon* a partir de amostras de pelame de 212 cães com suspeita clínica de dermatomicose na cidade de São Paulo. Estudo realizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco revelou frequência similar (0,21%) na investigação da microbiota superficial de 471 cães atendidos pelo Hospital Veterinário (CAVALCANTI et al., 2003).

A colonização é o mais importante, pois coloca o susceptível em contato direto com o agente infeccioso (MOREIRA, 2005; PAULINO et al., 2006). *Candida albicans* é a espécie mais conhecida e associada a dermatomicoses em cães e gatos e foi a única espécie isolada na população pesquisada. Leveduras do gênero *Candida* são comumente encontradas colonizando a mucosa oral, trato gastrointestinal e vagina de humanos e outros animais saudáveis, contudo, habitualmente, o mesmo não se aplica à pele saudável (GAMBALE et al., 1987; GHANNOUM; RADWAN, 1990; CLEFF et al., 2005).

Rhodotorula mucilaginosa também foi isolado obtido a partir da cultura de amostras colhidas do pelame de cães investigados. Essa levedura é considerada uma levedura emergente de infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos (LUNARDI et al., 2006). Trabalho de pesquisa recente sugere *R. minuta* como agente associado a granuloma interdigital em um filhote de nove meses da raça Bull terrier (TARRANT, 2005). Também é descrito caso de epididimite granulomatosa diagnosticado em um cão onde o agente identificado foi *R. glutinis* (KADOTA et al., 1995). A amostragem de caninos deverá ser ampliada em estudo futuro para que se obtenha melhor conhecimento a respeito da constituição leveduriforme da biota normal do tegumento desses animais.

Em relação às espécies silvestres, ainda são pouco expressivos os trabalhos de pesquisa relacionados aos aspectos elementares da sanidade desses animais. A crescente preocupação com o meio ambiente e a necessidade da conservação da fauna brasileira endêmica tem estimulado iniciativas pioneiras por todo o país. É o caso do Grupo de Trabalho pela Conservação do Tamanduá no Brasil (GCTB) que, sediado na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZ-SP), tem como missão promover ações que favoreçam a conservação das espécies de tamanduá no Brasil. Contando com a colaboração desse grupo, foi desenvolvida parte do presente trabalho.

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), um mamífero endêmico do cerrado brasileiro, é espécie atualmente considerada em risco de extinção. Entidades como a “União Internacional de Conservação da Natureza” (IUCN) incluem o tamanduá-bandeira em sua “Lista Vermelha” de espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2007). No Brasil, o tamanduá faz parte da “Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção” (IBAMA, 2007) e é classificado como espécie “criticamente em perigo” pelo “Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Estado do Paraná” (BRAGA, 2003).

As atividades de expansão da pecuária, a caça predatória e ataques por cães são as principais causas associadas ao declínio das populações de tamanduá em seu ambiente natural. Além disso, atropelamentos e queimadas também podem, seguramente, constituir fatores limitantes à sobrevivência da espécie em vida livre (BRAGA, 2003). Pouco se conhece sobre a microbiota fúngica de espécimes selvagens, dessa forma, a oportunidade de se incluir esses animais neste trabalho caracteriza objeto de interesse científico. A realização da investigação sobre a presença de *Trichosporon* spp. e outras leveduras de potencial patogênico na microbiota de tamanduás, permitirá a implementação de futuros programas sanitários que tenham por objetivo a conservação daquelas e outras espécies ameaçadas de extinção (BENTUBO et al., 2006).

Dos 30 isolados leveduriformes obtidos do pelame de tamanduás nessa investigação, dois, corresponderam ao gênero *Trichosporon*, ambos identificados como *T. asahii* (6,7%). Essa frequência representou 7,4% dos animais. Segundo a literatura, *Trichosporon* spp. já foram isoladas do solo e da água em ambiente selvagem (PAULA et al., 1983; MARTINS et al., 1989), o que justifica os isolamentos obtidos nesse trabalho. No entanto, levando-se em conta que os animais estudados vivem em condição de cativeiro, ou seja, são rotineiramente expostos ao contato com tratadores, médicos veterinários e outros profissionais da área, que também podem

albergar essa levedura na sua microbiota, não se pode ignorar a possibilidade desses indivíduos exercerem papel como agentes disseminadores de agentes microbianos diversos, entre eles, *T. asahii*, espécie que além de ser a mais importante nos casos de infecção humana oportunística (FLEMING et al., 2002; MADARIAGA et al., 2003), também é considerada agente comum do ambiente (SUGITA et al., 2000).

A literatura menciona apenas uma descrição de *Trichosporon* sp como agente patogênico de piedra branca superficial em primatas não humanos; entretanto, acredita-se que a ocorrência desses processos superficiais nos animais seja subestimada em virtude, principalmente, da carência de relatos na literatura (KAPLAN, 1959). Ainda não existem descrições de infecção causada por *T. asahii* em animais domésticos ou silvestres, de qualquer espécie. No entanto, a presença do microrganismo na microbiota associada à possível condição de imunossupressão, expõe os animais aos mesmos riscos aos quais estão expostos os seres humanos.

Nesta pesquisa, outras leveduras, como *Candida* spp., *Geotrichum* sp, *Cryptococcus* spp. e *Rhodotorula* sp, também foram isoladas do pelame dos animais submetidos à investigação. Dessas leveduras, os gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, merecem destaque especial, por constituírem patógenos importantes.

As leveduras do gênero *Candida* (*C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. kefyr*) foram isoladas da maior parte da população de tamanduás pesquisada (59,2%), sugerindo que estas sejam as leveduras mais comumente encontradas colonizando a superfície do corpo de tamanduás. Embora *C. albicans* seja a espécie mais relatada em casos de infecção envolvendo animais, as novas condições de vida, capazes de produzir estresse e conseqüentemente imunossupressão, promovem a emergência de novas espécies em processos patológicos, os quais serão gradativamente referenciados na literatura médico-veterinária (GREENE, 2006).

Cryptococcus spp. são patógenos reconhecidos em medicina humana. Esse gênero apresentou freqüência de isolamento de 13, 3% entre os tamanduás. A literatura sugere que pombos e outras aves sejam importantes disseminadoras de *C. neoformans*, espécie relevante em doença humana. Se levarmos em conta que a maior parte dos parques zoológicos do mundo sejam, freqüentemente, visitados por aves migratórias e que espécies de *Cryptococcus*, tais como *C. laurentii*, verificadas neste trabalho, já tenham sido isoladas a partir de fezes de aves migratórias como o ganso canadense (*Branta canadensis*), talvez não seria improvável a obtenção

de isolados da microbiota transitória superficial de animais residentes daqueles recintos visitados (FILION et al., 2006; ROSÁRIO et al., 2008).

A imunossupressão constitui fator determinante para a ocorrência de infecções oportunistas. Como já foi dito, doenças de base imunossupressoras (Aids, câncer, diabetes, transplante de órgãos, antibióticoterapia e/ou corticoterapia prolongadas) são fatores predisponentes bastante conhecidos, especialmente para seres humanos. Além disso, a caça predatória, tráfico e o cativeiro são situações potencialmente imunossupressoras, dado o nível de estresse ao qual os animais envolvidos estão sujeitos (TASHIRO et al., 1995; KREMERY et al., 1999).

A fonte de infecção oportunista para os pacientes imunocomprometidos pode ser a própria microbiota do indivíduo. Eventualmente, animais de estimação, como os cães investigados nessa pesquisa, que mantenham estreito contato com proprietários suscetíveis e sejam portadores de microrganismos potencialmente patogênicos em sua microbiota residente/transitória, também representam risco. Por isso, os isolados superficiais devem ser avaliados muito bem, relacionando-os ao aumento da incidência de fungemias como as causadas por *Trichosporon* spp. (MAYSER et al., 1996).

O diagnóstico precoce e preciso de infecções fúngicas oportunistas, é especialmente importante no caso de pacientes imunossuprimidos (ANAISSIE et al., 1992; COX; PERFECT, 1999). A caracterização microbiológica clássica de fungos, baseada em algumas de suas características morfológicas e fisiológicas, constitui a maneira mais simples e eficiente de se identificar esses microrganismos, sendo adotada pela grande maioria dos pesquisadores de referência na área (GUÉHO et al., 1992; GUÉHO et al., 1994; KURTZMAN; FELL, 1998; DE HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

Em virtude de possuírem parede celular multilamelar e septos tipo doliporo, *Trichosporon* spp. são classificados entre os *Basidiomycetes*, grupo de leveduras caracterizado pela produção de urease e incapacidade de fermentar carboidratos simples, como glicose. Por isso, essas duas características também foram empregadas na diferenciação entre *Trichosporon* spp. e outras leveduras, tais como *Candida* spp. (urease negativa e fermentação positiva) e *Geotrichum* spp. (urease negativa e fermentação negativa), para que se não fosse possível suprimir, pelo menos diminuir possíveis confusões na identificação do gênero (GUÉHO et al., 1992; GUÉHO et al., 1993; KURTZMAN; FELL, 1998; DE HOOG et al., 2000).

Contudo, a necessidade de uma identificação mais rápida e tão segura quanto dos métodos clássicos tem despertado interesse da comunidade médico-científica. Assim, fundamentadas na evolução tecnológica, técnicas modernas, como as de biologia molecular, vêm sendo propostas para a identificação rápida de leveduras patogênicas (SUGITA et al., 1998a; SUGITA et al., 1998b).

Afim de suprimir equívocos posteriores, na caracterização microbiológica das espécies dos isolados estudados, aplicou-se a técnica de biologia molecular (PCR) proposta por SUGITA et al (1998a).

Segundo os testes realizados nesse estudo, o isolado de *T. asahii* (CBS 2479) e a amostra de *T. asahii* (ICB 86/03), ambas semeadas em ASD, apresentaram melhor rendimento ao processo de extração de seu material genético, embora a maioria dos trabalhos utilize, habitualmente, meio de cultura YEPD para essa mesma finalidade (CARNOVALE et al., 2007). Neste trabalho, foram obtidos menores rendimentos que os obtidos por outros pesquisadores empregando-se o mesmo meio (RODRIGUEZ-TUDELA et a., 2005; CARNOVALE et al., 2007).

O surgimento das enzimas de lise da parede celular trouxe inúmeros benefícios para a biotecnologia, contribuindo também para muitos estudos relacionados com a indústria de alimentos, agricultura e a medicina. Nesta última, inclusive, permitiu a descoberta de vários produtos intracelulares de bactérias e leveduras (SALAZAR; ASENJO, 2007). No protocolo adotado por este trabalho, lisosima e proteinase k, foram as enzimas de lise de parede celular empregadas; outros pesquisadores também utilizaram essa mesma metodologia e obtiveram resultado satisfatório quanto à obtenção do material genético de *Trichosporon* spp. (RODRIGUEZ-TUDELA et a., 2005; CARNOVALE et al., 2007).

As amostras de *Trichosporon* spp. apresentaram aumento considerável de viscosidade, durante a adição das enzimas de lise da parede celular (lisosima e proteinase k). Essa substância viscosa, provavelmente, corresponde às proteínas que constituíam a parede do fungo e mediante o contato com as enzimas precipitaram. Isso foi, particularmente, mais intenso em *T.asahii* (ICB 86/03). Assim como a maioria dos microrganismos, *Trichosporon* possui alguns constituintes de natureza antigênica localizados na sua parede celular e a quantidade desses antígenos pode estar relacionada com a virulência da cepa. Cepas mais virulentas tendem a apresentar maior quantidade de antígenos na parede (CARNOVALE et al., 2007), isso pode sugerir que isolados

clínicos mais recentes podem apresentar atividade metabólica mais ativa e, portanto, mais material protéico.

A pesar do sucesso na aplicação da técnica, é importante salientar a dificuldade inicial encontrada no rompimento da parede celular, dificuldade sanada através do ajuste da solução de lise (proteínase K e lisozima) e tempo de incubação.

A amostra de *T. asahii* (CBS 2479) semeada em YEPD e incubada por 24h não apresentou precipitação do DNA após incubação em 20 °C negativos. Os 500µL a mais de etanol 70% que foram adicionados à amostra proporcionaram apenas a precipitação de traços suaves do DNA. Isso talvez esteja associado ao mal-rendimento observado nas amostras semeadas em YEPD. A purificação do DNA pelo método do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, empregada neste trabalho e por outros autores em leveduras do gênero *Trichosporon*, se mostrou satisfatório (CARNOVALE et al., 2007).

Trichosporon beigelli era a única espécie reconhecida até pouco tempo. Hoje, sabe-se que esta designação passa gradativamente a ser considerada não-válida (GUÉHO et al., 1992; GUÉHO et al., 1994). A partir dos estudos taxonômicos de Ghého et al. (1992; 1993; 1994), hoje adotados por outros pesquisadores (DE HOOG et al., 2000), outras espécies do complexo *Trichosporon* puderam ser incluídas nos livros de taxonomia fúngica, servindo de referência para a caracterização daquelas reconhecidas como patogênicas na presente investigação.

As diferentes espécies de *Trichosporon* spp. possuem coloração que pode variar de branco ao creme ou amarelo-acinzentado e aspecto pregueado, com superfície irregular composta por fissuras de diferentes profundidades e direções, que se distribuem sobre a superfície das colônias (YAMAMOTO et al., 1997; KURTZMAN; FELL, 1998; DE HOOG et al., 2000). O comportamento fenotípico dos isolados testados nessa pesquisa foi avaliado através da semeadura em placas contendo meio de ASD incubadas em diferentes temperaturas e leituras realizadas em diversos intervalos de tempo (ICHIKAWA et al., 2004; GUÉHO et al., 1994). Os resultados da análise estatística evidenciaram significância em apenas três isolados, que apresentaram diferença de crescimento entre as temperaturas de incubação testadas (melhor a 37 °C). Esses resultados foram pouco representativos na amostragem, não permitindo inferir se *Trichosporon* spp. crescem melhor a 25 °C ou 37 °C. Esses resultados discordam da maioria dos autores que acreditam que isolados provenientes de casos de infecção invasiva apresentem melhor

crescimento em 37 °C do que aqueles provenientes de infecção superficial (GUÉHO et al., 1992; GUÉHO et al., 1994; KURTZMAN; FELL, 1998; DE HOOG et al., 2000; LI et al., 2005).

O fato de a maior parte dos isolados ter apresentado textura rugosa e aspecto seco e opaco em temperatura ambiente era esperado, uma vez que, em geral, espécies de *Trichosporon* apresentam essas características (GUÉHO et al., 1994). No entanto, quando submetidas a 37 °C, essas mesmas amostras expressaram modificações morfológicas, tendendo a apresentar textura mais lisa e aspecto mais úmido e brilhante, o que no senso comum, se acredita ser mais característico de leveduras (KURTZMAN; FELL, 1998). Cultivos de crescimento predominantemente plano, como *T. mucoides* e *T. ovoides*, podem ser mais facilmente confundidos com leveduras não-*Trichosporon* do que *T. asahii* e *T. inkin*, especialmente quando incubados em 37 °C.

Pulverulência foi característica observada em isolados mantidos tanto a 25 °C como 37 °C e naquelas espécies (*T. asahii* e *T. inkin*) que caracteristicamente a apresentam, segundo refere a literatura consultada (GUÉHO et al., 1994; KURTZMAN; FELL, 1998; DE HOOG et al., 2000). A coloração creme foi prevalente na amostras incubadas a 37 °C, a pesar disso, não foi possível detectar diferença em relação a esse aspecto entre isolados superficiais e profundos, característica que poderia estar associada com poder patogênico daquelas amostras. Além disso, nenhum dos isolados, mesmo entre os provenientes de casos de tricosporonose, foi notada coloração acinzentada, relacionada a cepas mais virulentas e processos invasivos, como citam alguns pesquisadores (WALSH et al., 1986).

A formação de artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudohifas, são características do gênero *Trichosporon*. Essas estruturas foram analisadas nessa investigação e todos as 24 amostras expressaram essas características relatadas previamente por outros autores (GUÉHO et al., 1994; KURTZMAN; FELL, 1998; COX; PERFECT, 1999; DE HOOG et al., 2000). Artroconídios em forma de barril são característicos tanto de isolados de *T. asahii* como *T. mucoides*, sendo que este último pode ainda ser diferenciado do primeiro pela produção de segmentos terminais e, por vezes, ramos laterais diferenciados, denominados por outros autores como clavados (GUÉHO et al., 1994; DE HOOG et al., 2000). *Trichosporon inkin* e *T. ovoides* parecem expressar melhor distinção através de sua macromorfologia pois micromorfologicamente, ambos apresentam artroconídios cilíndricos. No entanto, diferenças sutis, principalmente em relação ao comprimento dos artroconídios podem ser notadas. *Trichosporon inkin* apresenta artroconídios

cilíndricos mais alongados e retos, além de conídios laterais simples, enquanto que *T. ovoides* expressa artroconídios curtos e discretamente abaulados, dessa maneira se diferenciando dos demais. Não foram observadas células apressórias em nenhum cultivo de *T. inkin* ou *T. ovoides*, o que discorda da literatura, que menciona esta ser uma característica para essas duas espécies (DE HOOG et al., 2000). Células apressórias são caracterizadas por modificação morfológica em segmentos terminais ou intercalares nas hifas do fungo, facilmente distinguíveis, por isso, sua ausência, neste caso, poderia estar associada às características individuais dos isolados. Além disso, o número de isolados investigados era pequeno. Talvez um maior número de isolados poderia evidenciar melhor a proporção de casos nos quais essa característica pode ser observada.

Segundo Guého et al. (1994), além das características morfológicas e habilidade de crescimento a 37 °C, as principais espécies de *Trichosporon*, consideradas patogênicas para o homem, podem ser diferenciadas por suas características fisiológicas e bioquímicas de assimilação de fontes de carbono e resistência a ciclo-heximide.

O número de fontes de carbono sugerido para o desempenho dos testes de assimilação de fontes de carbono varia conforme o número de espécies que se deseja identificar. Segundo De Hoog et al. (2000), as espécies de *Trichosporon* que apresentam importância médica podem ser diferenciadas pela assimilação de apenas quatro açúcares (L-Arabinose, Sorbitol, Melibiose e Mio-inositol). Os mesmos, foram eleitos para diferenciar as espécies de *Trichosporon* nesse trabalho, se prestando bem na diferenciação das espécies. No entanto, os testes foram desempenhados por quatro vezes e duas dificuldades, não relatadas na maioria dos trabalhos de pesquisa, mas encontradas no decorrer dos testes merecem consideração. Primeiro: melhores resultados foram obtidos quando o inóculo (tubo 5 da escala de MacFarland) foi filtrado em oito camadas de gaze esterilizada antes de ser incorporado ao meio de cultura; em segundo lugar: a visualização dos halos de assimilação puderam ser melhor visualizados quando a espessura do meio de cultura empregado era de aproximadamente meio milímetro.

A ciclo-heximida é um antibiótico, usualmente, empregado para o controle de fungos filamentosos contaminantes de cultivos laboratoriais. Além dos fungos filamentosos, inibidos pela ciclo-heximida, algumas leveduras também podem ser inibidas, como as do gênero *Trichosporon* (LACAZ et al., 2002). A literatura adotada cita a sensibilidade de algumas espécies de *Trichosporon* de importância médica à ciclo-heximida; entretanto, não esclarece a respeito dos critérios que estabelecem o conceito de crescimento e não-crescimento. Dessa forma, a

comparação entre a proporção de crescimento ao terceiro dia de incubação, do mesmo isolado, em meio puro e meio acrescido de ciclo-heximida sugeriu maior confiabilidade às leituras. A análise sugere que nenhum dos isolados foi sensível à concentração de 0,01% de ciclo-heximida, tanto a 25 °C quanto 37 °C. Contudo, seis das 28 amostras semeadas foram sensíveis a 0,1% de ciclo-heximida e uma a mais, sete, apresentaram sensibilidade a essa mesma concentração quando incubadas a 37 °C. As espécies consideradas sensíveis a 37 °C, segundo o critério adotado, foram *T. asahii* (n=2), *T. inkin* (n=1), *T. mucoides* (n=1) e *T. ovoides* (n=1). Os achados concordam, em parte, com a literatura, uma vez que apenas *T. inkin* é espécie que demonstra apresentar sensibilidade a 0,1% de ciclo-heximida (DE HOOG et al., 2000).

De maneira geral, o estabelecimento do diagnóstico de infecções fúngicas nosocomiais pode ser relativamente difícil, justificando a necessidade de métodos mais rápidos e seguros. CHROMagar Candida é um meio composto por substratos cromogênicos, que permite diferenciar as espécies de *Candida* capazes de assimilar cromógenos e, conseqüentemente, expressar cores variadas. Os sistemas comerciais disponíveis atualmente permitem a identificação rápida de um número restrito de leveduras de interesse clínico e, geralmente, a custos bastante elevados. O meio CRHOMagar Candida tem sido testado, experimentalmente, para espécies de outros gêneros (GIUSIANO et al., 2004).

É possível distinguir as colônias de *Candida* spp. pela pigmentação que produzem: *C. albicans* produz coloração esverdeada, *C. tropicalis* apresenta coloração azulada e *C. kruzei* uma cor que varia do branco-rosado ao rosa. Nesta investigação, todas as espécies de *Trichosporon* em meio de CHROMagar Candida apresentaram comportamento cromogênico que não permitiu a sua identificação. Inicialmente, as colônias eram verdes e, posteriormente, tornavam-se azuis ou lilás, independente da espécie. Dessa forma, CHROMagar Candida não parece ser uma alternativa promissora para a diferenciação de espécies de *Trichosporon*, uma vez que não há diferença entre as colorações expressas pelas diferentes amostras identificadas, como foi possível observar em relação à outras espécies de *Candida* que não aquelas já diferenciadas nesse meio (GIUSIANO et al., 2004).

Outro sistema comercial amplamente empregado para a identificação de microrganismos de importância médica é o API da empresa francesa Biomerieux®. A identificação é baseada no comportamento de assimilação de fontes de carbono apresentado pelo fungo. Nessa pesquisa, onde foi testado o sistema API ID 32C, não foi possível identificar as espécies de leveduras do

gênero *Trichosporon*, tal qual referencia o fabricante. O sistema considerou: perfil “excelente”, “aceitável” e “duvidoso” para três amostras de *T. asahii*, espécies compatíveis com as obtidas na identificação clássica; perfil “aceitável”, “fraca discriminação” e “duvidoso” para outras três amostras de *T. mucoides*, sendo duas delas identificadas como *T. asahii* e uma como *T. inkin* através de metodologia clássica; e perfil “bom para gênero” para um isolado de *T. inkin* que também foi considerado esta espécie pelos métodos clássicos de identificação. Resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa foram obtidos por LI et al. (2005), que testaram API 20C AUX na identificação de espécies do gênero *Trichosporon* e concluíram que o sistema não demonstrou bons resultados na diferenciação das espécies. CARNOVALE et al., (2007) também empregaram API ID 32C na identificação de *T. asahii* e *T. cutaneum*. No entanto, eles não discutem a eficiência do sistema na identificação, talvez por não se tratar do objetivo principal do trabalho. Além disso, o manual do sistema traz informação clara das espécies que podem ser caracterizadas e *T. cutaneum*, segundo o próprio fabricante, não é uma delas.

Os estudos relacionados aos fatores associados à virulência nas diferentes espécies patogênicas de fungos têm trazido consideráveis contribuições para o estudo da patogênese das infecções. A produção das enzimas extracelulares, pesquisadas neste trabalho (proteínase, fosfolipase, lipase e DNase), estão diretamente relacionadas com a virulência desses microrganismos (GÁCSERet al., 2007).

A expressão de enzimas extracelulares tem sido amplamente estudada em leveduras patogênicas para seres humanos e animais (COUTINHO; PAULA, 1999; NAGLIKet al., 2004). Inúmeros pesquisadores têm dispensado atenção à produção enzimática pelo gênero *Candida* (AHEARN et al., 1968; TEICHERT et al., 1989; NAGLIKet al., 2004). No entanto, existem poucos trabalhos na literatura brasileira a respeito das características de expressão da atividade enzimática por isolados de *Trichosporon* spp.

Atividade enzimática extracelular variou conforme a enzima pesquisada: lipase (92,8%), fosfolipase (57,1%), proteinase (46,4%) e DNase (28%) foram, em ordem decrescente, as exoenzimas com atividade detectável. As lipases são enzimas responsáveis pela hidrólise dos triglicerídeos, e conseqüente produção de glicerídeos e ácidos graxos livres; as fosfolipases atuam sobre os fosfolípidos presentes nas membranas celulares. Os achados obtidos na presente investigação sugerem que lipase e fosfolipase sejam as principais enzimas produzidas por *Trichosporon* spp. A literatura considera lipase um importante fator relacionado a patogenicidade

de *Basidiomycetes* não-*Trichosporon* como leveduras do gênero *Malassezia* (RAN et al., 1993). E reitera que a expressão de fosfolipase parece ser mais intensa em *M. furfur* do que nas outras espécies do mesmo gênero (GANDRA et al., 2006). No entanto, existem pesquisadores que afirmam não existir indícios suficientes que comprovem a influência dessas enzimas lipolíticas com a patogenicidade (VON KONELL, 2002). Em relação às espécies, houve pouca diferença em relação a expressão da atividade enzimática. Talvez estudos com número mais significativo de isolados permita inferências sobre esse aspecto.

O período de leitura para cada enzima foi estabelecido de acordo com o número de amostras que apresentou atividade enzimática em cada um dos dias de observação. Para lipase, a leitura deverá ser realizada no dia 5, com risco de falsos-negativos se realizada após esse período; para fosolipase, entre as 72 horas e o dia 5, em virtude das amostras de *T. asahii* e *T. ovoides* expressarem atividade mais tardiamente. A leitura para esta enzima é contra-indicada após os sete dias, com risco de falsos-negativos; para proteinase, às 72 horas. Para esta enzima não foi detectada diminuição da atividade enzimática das amostras positivas até o dia 15 de observação; e para DNase, entre os dias 5 e 7 de incubação, já que, neste caso, *T. inkin* e *T. ovoides* se mostraram mais precoces na expressão da atividade enzimática.

A síntese de melanina também tem sido associada à virulência de diversos microrganismos, incluindo várias espécies patogênicas de bactérias, fungos e helmintos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). Acredita-se que a melanina, observada na forma de grânulos acumulados na parede celular (ROSAS et al., 2000) proteja a célula microbiana dos efeitos da fagocitose e efeitos oxidativos durante a infecção (GÓMES; NOSANCHUK, 2003; MEDINICK et al., 2005).

A presença de melanina já foi descrita em diversos fungos patogênicos, como por exemplo: *Cryptococcus neoformans* (CASADEVALL et al., 2000; NOSANCHUK et al., 2000), *Histoplasma capsulatum* (NOSANCHUK et al., 2002), *Sporothrix schenckii* (MORRIS-JONES et al., 2003) e *Paracoccidioides brasiliensis* (GOMEZ et al., 2001; DA SILVA et al., 2006). No entanto, não existem, até o momento, trabalhos de pesquisa sobre esse assunto em leveduras do gênero *Trichosporon*. Procurou-se, portanto, investigar se leveduras do gênero *Trichosporon* possuem a capacidade de expressar melanina em sua parede celular.

A biossíntese de melanina ocorre por duas diferentes vias: a dihidroxifenilalanina (DOPA-melanina) e dihidroxinaftaleno (DHN-melanina). Essa biossíntese pode ser induzida

laboratorialmente, pela via DOPA-melanina, através da adição de L-DOPA ao meio de cultura, como procedido neste trabalho. A enzima lacase é a responsável pela síntese de melanina pela via DOPA e a determinação de sua atividade fundamenta os procedimentos de indução laboratorial de melanização aos quais as células de *Trichosporon* sp foram submetidas (LANGFELDER et al., 2003). Todas as amostras empregadas nessa pesquisa semeadas sem suplementação de L-DOPA, apresentaram valores de absorbância menores do que aqueles apresentados pelas amostras incubadas no mesmo meio com suplementação.

Amostras produtoras de melanina apresentam enegrecimento do meio líquido quimicamente definido durante a incubação. Contudo, não foi observado enegrecimento do cultivo de *T. asahii* (CBS 2479), embora o cultivo de *T. asahii* (ICB 86/03) tenha apresentado discreto escurecimento. Isso poderia sugerir uma baixa produção ou expressão de melanina por *Trichosporon* spp. Em relação à atividade da lacase, embora os níveis de absorbância não tenham sido elevados, o que novamente confirma a baixa atividade da enzima, os valores apresentados pela amostra de *T. asahii* (ICB 86/03), correspondem à coloração apresentada, mesmo que discreta. Apesar, destes valores terem sido próximos aos apresentados pelo controle, não foram considerados positivos (DA SILVA et al., 2006). Embora na presente investigação não se tenha detectado a expressão de melanina na parede celular de *Trichosporon asahii*, essa hipótese não pode ser descartada, uma vez que a produção de melanina pode estar relacionada a mais de uma via metabólica (LANGFELDER et al., 2003). Além disso, diferenças tanto intraespecíficas como interespecíficas devem ser levadas em conta.

Há muito tempo, que já se conhece a estreita afinidade que existe entre os *Basidiomycetes* dos gêneros *Cryptococcus* e *Trichosporon* (MELCHER et al., 1991; GUÉHO et al., 1993). O primeiro, responsável por inúmeros processos infecciosos invasivos em seres humanos durante a epidemia de Aids; o segundo, patógeno oportunista reemergente, especialmente, entre indivíduos portadores de doença hematológica maligna, dos dias atuais (TASHIRO et al., 1995; KREMERY et al., 1999). Ambos, portadores do mesmo antígeno superficial: glucuronoxilomanana (GXM). A esse antígeno comum, tem sido atribuída a ocorrência de reações cruzadas em testes sorológicos realizados em pacientes portadores da forma disseminada da doença produzida por estes dois microrganismos, desencadeando enorme perplexidade entre os microbiologistas e médicos (MCMANUS; JONES, 1985; MELCHER et al., 1991). A decorrente importância que a glucuronoxilomanana (GXM) tem demonstrado exercer sobre a virulência de *Trichosporon* spp.,

tem chamado a atenção dos pesquisadores. Neste trabalho, empregou-se a técnica de imunofluorescência direta para confirmação da presença desse antígeno na parede celular de *T. asahii*, espécie mais comum nos processos disseminados (HERBRECHT et al., 1993), obtendo-se resultados positivos. A confirmação da presença desse antígeno de propriedades imunomodulatórias na parede de *Trichosporon* sp fundamenta a preocupação dos pesquisadores em relação ao grau de patogenicidade desses fungos e conseqüentemente, justifica a dificuldade encontrada por médicos no estabelecimento da cura dos pacientes acometidos (WALSH et al., 1993; LYMAN et al., 1995).

As elevadas taxas de mortalidade decorrentes de infecções causadas por leveduras emergentes, têm fundamentado a busca por protocolos terapêuticos mais eficazes e menos tóxicos ao mesmo tempo, que novos fármacos vêm sendo criados (GARCIA-MARTOS et al., 2001; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

A anfotericina B foi considerada a droga de eleição para os casos de tricosporonose (BASSETTI et al., 2004). No entanto, desde a década de 1990, quando ainda se empregava a designação *T. beigelli*, estudos sugeriam a resistência desse fungo ao polieno, suspeita que, posteriormente aos estudos taxonômicos de reclassificação do gênero *Trichosporon*, se confirmou em *T. asahii* (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). Neste estudo, os isolados de *T. asahii* apresentaram valores de CIM=0,023-3 µg/mL bastante inferiores àqueles (CIM=8-16 µg/mL) observados por outros autores (LI et al., 2005). Os resultados de sensibilidade de *T. asahii* frente a anfotericina B verificados por RODRIGUEZ-TUDELA et al. (2005) foram bastante variáveis (CIM=0,5-16 µg/mL), mas ainda assim, superiores aos encontrados na presente investigação. Em relação às outras espécies de *Trichosporon*, a literatura concorda que as não-*T. asahii* (como as estudadas neste trabalho [*T. inkin*, *T. mucoides*, *T. ovoides*]) sejam mais resistentes aos triazólicos do que anfotericina B (PAPHITOU et al., 2002; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). Nessa investigação, isolados de *T. inkin* apresentaram CIM=0,016-3 µg/mL; *T. mucoides* CIM=0,25-0,5 µg/mL e *T. ovoides* CIM=0,032-16 µg/mL para anfotericina B. Em todos os casos, exceto *T. mucoides*, os CIM para anfotericina B ultrapassaram os 2.0 µg/mL, o que confirma a idéia compartilhada por alguns pesquisadores, de que esses valores representam resistência dos isolados (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). As amostras de *T. mucoides*, por outro lado, se mostraram sensíveis ao polieno, apresentando valores de CIM inferiores a 2.0 µg/mL, contrariando assim a idéia de outros autores (GARCIA-MARTOS et al., 2001).

Segundo Anaissie et al. (1992), a administração de anfotericina B e fluconazol em associação foi capaz de prolongar a sobrevivência em estudo de tricosporonose experimental. Segundo esses autores, esse fato foi atribuído ao fluconazol, responsável também pela diminuição da contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs) nos rins dos camundongos infectados. Na presente investigação, as CIMs para fluconazol foram 0,24-32 µg/mL para *T. asahii*; 0,125-32 µg/mL para *T. inkin* e 1,5-64 µg/mL para *T. ovoides*. Um isolado de *T. inkin* (20%) foi resistente ao fluconazol, o que chama a atenção para os valores máximos de CIM encontrados, que são relativamente, elevados. Resistência ao fluconazol já foi descrita na literatura (HADLEY et al., 2002). Todos os isolados de *T. mucooides* testados foram resistentes ao fluconazol, contudo existem relatos na literatura que demonstram sucesso no tratamento da tricosporonose causada por *T. mucooides*, quando da administração *in vivo* de fluconazol (NETTLES et al., 2003).

Trabalhos de pesquisa recentes têm demonstrado a superioridade dos azólicos em relação a anfotericina B no tratamento da tricosporonose (PAPHITOU et al., 2002; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). Itraconazol expressou efetividade nos testes de sensibilidade *in vitro* realizados para *Trichosporon* spp. Concentrações inibitórias mínimas, relativamente, menores do que as observadas para fluconazol, foram verificadas quando itraconazol foi testado para *T. asahii* (0,047-1 µg/mL), *T. inkin* (0,32-4 µg/mL) e *T. ovoides* (0,032-8 µg/mL). Esse resultado condiz com o encontrado por outros pesquisadores (LI et al., 2005). *Trichosporon mucooides* expressou resistência da maioria dos isolados testados. Melhores resultados foram observados com anfotericina B do que itraconazol. Esses dados não condizem com a literatura consultada que refere maior potência dos azólicos do que anfotericina B contra leveduras do gênero *Trichosporon*.

Cetoconazol apresentou CIMs, relativamente, menores para *T. inkin* (0,25-3 µg/mL) e *T. ovoides* (0,09-2 µg/mL) do que para *T. asahii* (0,032-6 µg/mL), comprovando a boa ação que cetoconazol apresenta para o tratamento de infecções superficiais, tais como a piedra branca genital e piedra branca do cabelo, respectivamente, causadas por aquelas duas espécies com maior frequência (WALZMAN; LEEMING, 1989; KWON-CHUNG; BENNETT et al., 1992; HERBRECHT et al., 1993). *Trichosporon mucooides* também apresentou resistência para cetoconazol, desta vez, em metade das amostras. Essa espécie é pouco associada a processos infecciosos superficiais, sendo pouco exposta a esse princípio. No entanto, é importante ser levado em conta, o potencial que qualquer espécie - mesmo aquelas nunca antes referenciadas -

tem de causar doença invasiva nos dias atuais. Assim, essa taxa de resistência deve ser mais estudada a fim de que se obtenha melhor avaliação sobre *T. mucoides* em relação aos antifúngicos.

As CIMs verificadas para voriconazol foram as menores entre todos os antifúngicos testados. Os valores (0,047-1 µg/mL para *T. asahii*; 0,038-1 µg/mL para *T. inkin* e 0,023-0,75µg/mL para *T. ovoides*) foram, inclusive, menores do que os do itraconazol, como relatam outros autores para as mesmas espécies consideradas sensíveis ao triazólico nesse trabalho, sendo um antifúngico muito potente para o tratamento da trichosporonose (MACGINNIS et al., 1998; PAPHITOU et al., 2002; UZUN et al., 2000; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005). As amostras de *T. mucoides* (50%) ainda apresentaram resistência ao azólico. Aquelas que apresentaram CIMs, o fizeram de maneira mais elevada (0,25-4 µg/mL) do que ocorreu para as demais espécies testadas, sugerindo resistência.

A caspofungina, um antifúngico moderno do grupo das equinocandinas, apresenta atividade muito satisfatória contra leveduras do gênero *Candida*, especialmente aquelas associadas às fungemias, contudo ainda são poucos os trabalhos que ilustram sua atividade antifúngica contra *Trichosporon* spp. (PFALLER et al., 2002; BASSETTI et al., 2004). Nesta investigação, o fato de 100% dos isolados de *T. asahii* (13), *T. inkin* (5) e *T. ovoides* (6) apresentarem resistência a esse princípio, chamou a atenção. A literatura refere um caso de sucesso no emprego da caspofungina como agente único no tratamento de um paciente com trichosporonose causada por *T. inkin* (MADARIAGA et al., 2003). Outros pesquisadores atribuem o efeito da caspofungina sobre *Trichosporon* spp. ao sinergismo que esta desempenha quando administrada em associação aos azólicos ou anfotericina B (BASSETTI et al., 2004). De fato, existem inúmeros fatores que influenciam na determinação da suscetibilidade de fungos. Estudos que melhor avaliem a correlação que existe entre os testes *in vitro* e *in vivo* devem ser estimulados, de maneira desprendida e criteriosa, para que com isso, menos pacientes debilitados venham a óbito por causas secundárias, como trichosporonoses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABIA-BASSEY, L. N.; UTSALO, S. J. Yeast associated with human infections in south-eastern Nigeria. **Mycoses**, v. 49, p.510-515, 2006.

AHEARN, D. G.; MEYERS, S. P.; NICHOLS, R. A. Extracellular proteinases of yeasts and yeastlike fungi. **Appl. Microbiol.**, v. 16, p. 1370-1374, 1968.

ALVIANO, D.S.; FRANZEN, A.J.; TRAVASSOS, L.R.; HOLANDINO, C.; ROSENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C.S.; RODRIGUES, M.L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infect. Immun.**, v.72, p.229-237, 2004.

ANAISSE, E.; GOKASLAN, A.; HACHEM, R.; RUBIN, R.; GRIFFIN, G.; ROBINSON, R.; SOBEL, J.; BODEY, G. Azole therapy for trichosporonosis: clinical evaluation of eight patients, experimental therapy for murine infection, and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, p. 781-787, 1992.

ANDO, M.; SAKATA, T.; YOSHIDA, K.; YAMASAKI, H.; ARAKI, S.; ONOUE, K.; SHINODA, T. Serotype-related antigen of *Trichosporon cutaneum* in the induction of summer-type hypersensitivity pneumonitis: correlation between serotype of inhalation challenge-positive antigen and that of the isolates from patient's homes. **J. Allergy Clin. Immun.**, v.85, p.36-44, 1990.

ARAÚJO, A. J. G.; BASTOS, O. M. P.; SOUZA, M. A. J.; OLIVEIRA, J. C. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, p. 445-455, 2003.

BASSETTI, M.; BISIO, F.; DI BIAGIO, A.; PIERRI, I; BALOCCO, M.; SORO, O.; CRUCIANI, M.; BASSETTI, D. *Trichosporon asahii* infection treated with caspofungin combined with liposomal amphotericin B. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 1, p. 575-577, 2004.

BARCHIESI, F.; MORBIDUCCI, V.; ANCARANI, F.; ARZENI, D.; SCALISE, G. *Trichosporon beigelii* in an AIDS patient. **AIDS**, v. 7, p. 139-140, 1993.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BENTUBO, H. D. L.; FEDULLO, J. D. L.; CORRÊA, S. H. R.; TEIXEIRA, R. H. F.; COUTINHO, S. D. A. Isolation of *Microsporium gypseum* from the haircoat of helth wild felids kept in captivity in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 148- 152, 2006.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acad.**, v. 5, p. 159-172, 2004.

BRAGA, F. G. Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), espécie em perigo: uma preocupação no Estado do Paraná. **Acta Biol.**, v. 33, p. 193-194, 2003.

CARNOVALE. S.; LORENZO J.; KAUFMAN S.; FINQUELIERVICH J. GUELFAND L. Genotypic study of strains belonging to the genus *Trichosporon*. **Med. Mycol.**, v. 45, p. 51-56, 2007.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L., NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, p. 354-358, 2000.

CAVALCANTI, M. P.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES-FILHO, J. B.; ALVES, L. C. Frequência de dermatófitos e fungos saprófitas em caninos e felinos com sintomatologia sugestiva de dermatopatia micótica atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE. **Clin. Vet.**, Ano VIII, n. 43, p. 24-28, 2003.

CLEFF, M. B.; DE LIMA, A. P.; DE FARIA, R. O.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. DE A.; DE ARAÚJO, F. B.; NASCENTE, P. DA S.; NOBRE, M. DE O.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Candida* spp. from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 201-204, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Villanova, PA, 1997. Approved Standard. Document M 27-A., v. 17, n. 9.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Wayne, PA, 2002. Approved Standard - Second Edition. Document M 27-A2., v. 22, n. 15.

CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from *Salmonella* and *Shigella* types. **J. Bacteriol.**, n. 52, p. 461-466, 1946.

COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Topley & Wilson's: microbiology and microbial infections**. 9. ed. London: Oxford University Press, 1999. 766p.

COPPOLA S.; ANGARANO G.; MONTAGNA M. T.; CONGEDO P.; BELLISARIO A.; MONNO L.; INFANTE G.; PASTORE G. *Trichosporon beigelli* infection in AIDS patients undergoing antifungal prophylaxis – Report of two cases. **J. Micol. Méd.**, v. 3, p.169-171, 1993.

COUTINHO, S. D.; PAULA, C. R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 73-76, 2000.

COX, G. M.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon species*. In: Ajello, L.; Hay, R.J. **Topley & Wilson's: microbiology and microbial infections**. 9. ed. London: Oxford University Press, 1999. p. 460-484.

CROCCO, E. I.; MIMICA, L. M. J.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, p. 689-697, 2004.

DA SILVA, M. B.; MARQUES, A. F.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 197-205, 2006.

DE ALMEIDA-JUNIOR, H. L.; RIVITTI, E. A.; JAEGER, R. G. White piedra: ultrastructure and a new microecological aspect. **Mycoses**, v. 33, p. 491-497, 1990.

DE HOOG, G. S. Risk assessment of fungi reported from humans and animals. **Mycoses**, v. 39, p. 407-417, 1996.

DE HOOG, G. S.; GUARRO J.; GENÉ J.; FIGUEIRAS M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed., Utrecht & Réus: Centraalbureau voor Schimmelcultures to Universitat Rovira; Virgili, 2000. 126 p.

DIGBY, J.; KALBFLEISCH, J.; GLENN, A.; LARSEN, A.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D. serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care unit patients. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.10, p.882-885, 2003.

ELLNER, K.; MCBRIDE, M. E.; ROSEN, T.; BERMAN, D. Prevalence of *Trichosporon beigelii*. Colonization of normal perigenital skin. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 99-103, 1993.

ESPINEL-INGROFF, A.; KISH, C. W.; KERKERING, T. M.; FROMTLING, R. A.; BARTIZAL, K.; GALGIANI, J. N.; PFALLER, M. A.; GERARDEN, T.; RINALDI, M. G.; FOTHERGILL, A. Collaborative comparison of both macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30; p. 3138-3145, 1992.

FERRAZZA, M. S. H.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev. Bras. Ginecol. Obst.**, v. 27, p. 58-63, 2005.

FILION, T.; KIDD, S.; AGUIRRE, K. Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. **Mycopathologia**, v. 162, p. 363-368, 2006.

FISCHER L.; STERNECK M. Invasive fungal infections in patients after liver transplantation. **Mycoses**, v. 48, p. 27-35, 2005.

FLEMING, R. V.; WALSH, T. J.; ANAISSIE, E. J. Emerging and less common fungal pathogens. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 915-933, 2002.

FRICKER-HIDALGO, H.; VANDAPEL, O.; DUCHESNE, M. A.; MAZOYER, M. A.; MONGET, D.; LARDY, B.; LEDEAU, B.; FRENEY, J.; AMBROISE-THOMAS, P.; GRILLOT, R. Comparision of the new API *Candida* system to the ID 32 C system for identification of clinical important species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34: p. 1846-1848, 1996.

GÁCSEER, A.; STEHR, F.; KRÖGER, C.; KREDICS, L.; SCHÄFER, W.; NOSANCHUK, J.D. Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 4710-4718, 2007.

GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; LARSSON, C. E. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.**, v. 24, p. 187-191, 1987.

GANDRA, R. F.; SIMÃO, R. C. G.; MATSUMOTO, E. F.; SILVA, B. C. M.; RUIZ, L. S.; SILVA, E. G.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients. **Mycopathologia**, v. 162, p. 273-280, 2006.

GARCIA-MARTOS, P.; DOMINGUEZ, I.; MARIN, P.; GARCIA-AGUDO, R.; AOUI, S.; MIRA, J. Antifungal susceptibility of emerging yeasts pathogens. **Enferm. Infect. Microb. Clin.**, v. 19, p. 249-256, 2001.

GARCÍA-MARTOS, P.; GARCÍA-AGUDO, L.; RUIZ-ARAGÓN, J.; SALDARREAGA, A.; MARÍN, P. Asimilación de carbohidratos por cepas de *Rhodotorula glutinis* de origen clínica y ambiental. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 21, p. 90-92, 2004.

GHANNOUM, M. A.; RADWAN, S. S. **Candida adherence to epithelial cells**. Florida: CRC Press, 1990. 113 p.

GIRMENIA, C.; PAGANO, L.; MARTINO, B.; D'ANTONIO, D.; FANCI, R.; SPECCHIA, G.; MELILLO, L.; BUELLI, M.; PIZZARELLI, G.; VENDITTI, M.; MARTINO, P. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1818-1828, 2005.

GIUSIANO G. E.; MANGIATERRA M.; ROJAS F.; GÓMES V. Yeasts species distribution in neonatal intensive care units in northeast Argentina. **Mycoses**, v. 47, p. 300-303, 2004.

GOMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D.; DIEZ, S.; YOUNGCHIM, S.; AISEN, P.; CANO, L. E.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A.J. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5760-5767, 2001.

GÓMES, B.L.; NOSANCHUK, J.D. Melanin and fungi. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, p. 91-96, 2003.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. 1387 p.

GUÉHO, E.; SMITH, M. T.; DE HOOG, G. S.; BILLON-GRAND, G.; CHRISTEN, R.; BATENBURG-VAN DER VEET, W. H. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. **Ant. Leeuwenhoek**, v. 61, p. 289-316, 1992.

GUÉHO, E.; IMPROVISI, L.; CHRISTEN, R.; DE HOOG, G.S. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. **Ant. Leeuwenhoek**, v.63, p.175-189, 1993.

GUÉHO, E.; IMPROVISI, L.; DE HOOG, G. S.; DUPONT, B. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**, v. 37, p. 3-10, 1994.

HADLEY, S.; MARTINEZ, J. A.; MCDERMOTT, L.; RAPINO, B.; SNYDMAN, D. R. Real-time antifungal susceptibility screening aids management of invasive yeast infection in immunocompromised patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, p. 415-419, 2002.

HAMILTON, A. J.; GOMEZ, B. L. Melanins in fungal pathogens. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 189-191, 2002.

HERBRECHT, R.; KOENIG, H.; WALLER, J.; LIU, K. L.; GUÉHO, E. *Trichosporon* infections: clinical manifestations and treatment. **J. Mycol. Méd.**, v. 3, p. 129-136, 1993.

HSIAO, G.H.; CHANG, C.C.; CHEN, J.C.; KUO, W.L.; HUANG, S.F. *Trichosporon beigeli* fungemia with cutaneous dissemination. A case report and literature review. **Acta Dermatol. Venereol.**, Stockh, v.74, p. 481-482, 1994.

ICHIKAWA T.; SUGITA T.; WANG L.; YOKOYAMA K.; NISHIMURA K.; NISHIKAWA A. Phenotypic switching and β -N-Acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. **Microbiol. Immunol.**, v. 48, p. 237-242, 2004

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <www.ibama.gov.br/fauna/extinção.php>. Acesso em: 20 Jul. 2007.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. Disponível em: <www.redlist.org/info/introduction>. Acesso em: 20 Jul. 2007.

KADOTA, K.; UCHIDA, K.; NAGAMOTO, T.; GOTO, Y.; SHINJO, T.; HASEGAWA, T.; OGAWA, H.; YAMAGUCHI, R.; TATEYAMA, S. Granulomatous epididymitis related to *Rhodotorula glutinis* infection in a dog. **Vet. Pathol.**, v. 32, p. 716-718, 1995.

KAPLAN, W. Piedra in lower animals; a case report of white piedra in a monkey and a review of literature. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 134, p. 113-117, 1959.

KARASHIMA, R.; YAMAKAMI, Y.; YAMAGATA, E.; TOKIMATSU, I.; HIRAMATSU, K.; NASU, M. Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in *Trichosporon asahii* by repeated passage in mice. **J. Med. Microbiol.**, v.51, p.423-432, 2002.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 866 p.

KREMERY, V.; MATEICKA, F. Jr.; KUNOVA, A.; SPANIK, S.; GYARFAS, J.; SYCOVA, Z.; TRUPI, J. Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazole. **Supp. Care Cancer**, v. 7, p. 39-43, 1999.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts, a taxonomic study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier. 1998. Parte VIa, 1055 p.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. Leveduras de interesse médico. *In*: LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica LACAZ**. 9. ed. São Paulo: Savier, 2002. p. 123-173.

LANGFELDER L.; STREIBEL M.; JAHN B.; HAASE G.; BRAKHAGE A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Gen. Biol.**, v. 38, p. 143-158, 2003.

LESTINI, B.J.; CHURCH, J.A. *Trichosporon pullulans* as a complication of chronic granulomatous disease in a patient undergoing immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, p. 87-89, 2006.

LI, H. M.; DU, H. T.; LIU, W.; WAN, Z.; LI, R. Y. Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon* species. **Mycopathologia**, v. 160, p. 217-225, 2005.

LODDER, J.; KREGER VAN-RIJ, N. J. W. **The yeasts: A taxonomic study**. 2. ed. Amsterdam: North-Holland, 1970. 1012 p.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; MANZANO-GAYOSSO, P.; MIER, T.; MÉNDEZ-TOVAR, L. J.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 36, p. 17-20, 1994.

LYMAN, C. A.; DEVI, S. J.; NATHANSON, J.; FRASCH, C. E.; PIZZO, P. A.; WALSH, T. J. Detection and quantitation of the glucuronoxylomannan-like polysaccharide antigen from clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigelii* and implications for pathogenicity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 126-130, 1995.

LUNARDI, L. W.; AQUINO, V. R.; ZIMERMAN, R. A.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 60-63, 2006.

MADARIAGA, M. G.; TENORIO, A.; PROIA, L. *Trichosporon inkin* peritonitis treated with caspofungin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5827-5829, 2003.

MCGINNIS, M. R.; PASARELL, L.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; COOPER, C. R. JR.; RINALDI, M. G. In vitro activity of voriconazole against selected fungi. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 239-242, 1998.

MCMANUS, E.J.; JONES, J.M. Detection of a *Trichosporon beigelii* antigen cross-reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides in serum from a patient with disseminated *Trichosporon* infection. **J. Clin. Microbiol.**, v.21, p.681-685, 1985.

MAKIMURA, K.; MURAYAMA, S.Y.; YAMAGUCHI, H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, p. 358-364, 1994.

MARIAT, F.; ADAM-CAMPOS, C. La technique du carré du tapis, méthode simple de prélèvement dans les mycoses superficielles. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 113, p. 666-668, 1967.

MARR, K. A.; RUSTAD, T. R.; REX, J. H. WHITE, T.C. The trailing endpoint phenotype in antifungal susceptibility testing in pH dependent. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 1383-1386, 1999.

MARTINEZ-LACASA, J.; MANA, J.; NIUBO, R.; RUFI, G.; SAEZ, A.; FERNANDEZ-NOGUEZ, F. Long-term survival of a patient with prosthetic valve endocarditis due to *Trichosporon beigelii*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 10, p. 756-758, 1991.

MARTINS, M. T.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; PELLIZARI, V. H. Utilização de bactérias e fungos como indicadores na avaliação de fatores fisiográficos que interferem nos processos de autodepuração de um córrego subtropical. **Rev. Microbiol.**, v. 20, p. 278-291, 1989.

MARTINS-DINIZ, J. N.; DA SILVA, R. A. M.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, p. 398-405, 2005.

MARTY, F.M.; BAROUCH, D.H.; COAKLEY, E.P.; BADEN, L.R. Disseminated trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5317-5320, 2003.

MAYSER P.; HUPPERTZ M.; PAPARASSILIS C.; GRUNDER K. Fungi of the *Trichosporon* genus. Identification, epidemiology and significance of dermatologic disease pictures. **Der Haut.; Zeitschrift für Dermatol., Venerol., und verwandte Geb.**, v. 47, p. 913-920, 1996.

MEDINICK A. J.; NOSANCHUKJ. D.; CASADEVALL A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2012-2019, 2005.

MELCHER, G.P.; REED, K.D.; RINALDI, M.G.; LEE, J.W.; PIZZO, A.P.; WALSH, T.J. Demonstration of a cell wall antigen cross-reacting with cryptococcal polysaccharide in experimental disseminated trichosporonosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p.192-196, 1991.

MEYER, M. H.; LETSCHER-BNI, V.; WALLER J.; LUTZ, P.; MARCELLIN, L.; HERBRECHT, R. Chronic disseminated *Trichosporon asahii* infections in a leukemic child. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 22-25, 2002.

MOREIRA, M. E. L. Controvérsia a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. **J. Pediatr.**, v. 81, p. S52-S58, 2005.

MORETTI-BRANCHINI, M. L.; FUKUSHIMA, K.; SCHOREIBER, A. Z.; NISHIMURA, K.; PAPAORDANOU P. M.; TRABASSO, P.; TANAKA, R.; MIYAJI, M. *Trichosporon* species infection in bone MARrow transplanted patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 39; p. 161-164, 2001.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B. L.; AISEN, P.; HAY, R. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* *in vitro* and during mammalian infection. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4026-4033, 2003.

MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H.; AL-DUBOON, H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, v. 40, p. 465-469, 1997.

NAHASS, G. T.; ROSEMBERG, S. P.; LEONARDI, C. L.; PENNEYS, N. S. Disseminated infection with *Trichosporon beigelii*. Report of a case and review of the cutaneous and histologic manifestations. **Arch. Dermatol.**, v. 129, p. 1020-1023, 1993.

NAGAI, H.; YAMAKAMI, Y.; HASHIMOTO, A.; TOKIMATSU, I.; NASU, M. PCR detection of DNA specific for *Trichosporon* species in serum of patients with disseminated trichosporonosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 694-699, 1999.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell. Microbiol.**, v. 6, p. 915-926, 2004.

NETTLES, R. E.; NICHOLS, L.S.; BELL-MCGUINN, K.; PIPELING, M. R.; SCHEEL, P. J. JR.; MERZ, W. G. Successful treatment of *Trichosporon mucoides* infection with fluconazole in a heart and kidney transplant recipient. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. E63-E66, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; ROSAS, A. L.; LEE, S. C.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. **Lancet**, v. 355, p. 2049-2050, 2000.

NOSANCHUK, J. D.; GOMEZ, B. L.; YOUNGCHIM, S.; DIEZ, S.; AISEN, P.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments *in vitro* and during mammalian infection. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5124-5131, 2002.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 203-223, 2003.

NOSANCHUK, J.D.; VAN DUIN, D.; MANDAL, P.; AISEN, P.; LEGENDRE, A.M.; CASADEVALL, A. *Blastomyces dermatitidis* produces melanin *in vitro* and during infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.239, p.187-193, 2004.

NUCCI, M.; PULCHERI, W.; SPECTOR, N.; BUENO, A. P.; BACHA, P. C.; CAIUBY, M. J.; DEROSI, A.; COSTA, R.; MORAIS, J. C.; OLIVEIRA, H. P. Fungal infections in neutropenic patients. A 8-year prospective study. **Rev. Inst. Med. Trop. de Sao Paulo**, v. 37, p. 397-406, 1995.

OLIVEIRA, J. A.; BARROS, J. A.; CORTEZ, A. C. A.; OLIVEIRA, J. S. R. J. Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81, p. 238-243, 2006.

PAPHITOU, N. I.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAETZNICK, V. L.; RODRIGUEZ, J. R.; CHEN, E.; REX, J. H. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 1144-1146, 2002.

PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W. Yeasts from beaches in the Southern area of São Paulo, Baixada Santista, Brazil. **Rev. Microbiol.**, v. 14, p. 136-143, 1983.

PAULINO, L. C.; TSENG, C. H.; STROBER, B. E.; BLASER, M. J. Molecular analysis of fungal microbiota in sample from healthy human skin and psoriatic lesions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 2933-2941, 2006.

PASQUALOTTO, A. C.; ANTUNES, A. G. V.; SEVERO, L. C. *Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis. **Rev. Inst. Med. Trop. de Sao Paulo**, v. 48, p. 123-127, 2006.

PFALLER, M. A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N.; DIEKEMA, D.J. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6.970 clinical isolates of *Candida* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 1723-1727, 2002.

PINTO, M. R.; RODRIGUES, M. L.; TRAVASSOS, L. R.; HAIDO, R. M. T.; WAIT, R.; BARRETO-BERGTER, E. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. **Glycobiology**, v. 12, p. 251-260, 2002.

PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; MUHLEN, G. S. Aplicações da técnica de eletroforese de campo pulsado para separação de cromossomos de microrganismos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 229-251.

POLACHECK, I.; LEBENS, G. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, p. 65-71, 1989.

POLAK, A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. **Mycoses**, v.33, p.215-224, 1990.

PORTO, E.; TAKAHASHI, N.; HEINS, E. M.; LACAZ, C. DA S. Mieno método para microcultivo de hongos. **Rev. Argent. Micol.**, v. 4, p. 24-29, 1981.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of fosfolipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, p. 7-14, 1982.

RAN, Y.; YOSHIKE, T.; OGAWA, H. Lipase of *M. furfur*: some properties and their relationship to cell growth. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 77-85, 1993.

REIS, E.; TANAKA, K.; BRUKER, G.; CHAZALET, V.; COLEMAN, D.; DEBEAUPUIS, J.P.; HANAZAWA, R.; LATGE, J. P.; LORTHOLARY, J.; MAKIMURA, K.; MORRISON, C. J.; MURAYAMA, S.Y.; NAOE, S.; PARIS, S.; SARFATI, J.; SHIBUYA, K.; SULLIVAN, D.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 249-257, 1998.

RESTREPO, A.; JIMENEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J. Clin. Microbiol.**, v. 12, p. 279-281, 1980.

RIEDEL, D. J.; JOHNSON, J. K.; FORREST, G. N. *Rhodotorula glutinis* fungemia in a liver-kidney transplant patient. **Transpl. Infect. Dis.**, v. 10, p. 197-200, 2007.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.; DIAZ-GUERRA, T. M.; MELLADO, E.; CASSO, V.; TAPIA C.; PERKINS, A.; GÓMES-LOPEZ, A.; RODERO, L.; CUENCA-ESTRELLA M. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 4026-4034, 2005.

ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D.; FELDMESSER, M.; COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis of polymerized by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2845-2853, 2000.

ROSARIO, I.; ACOSTA, B.; COLOM, F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, p. S13-S18, 2008.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, p. 233-244, 1982.

SALAZAR, O.; ASENJO, J. A. Enzymatic lysis of microbial cells. **Biotechnol. Lett.**, v. 29, p. 985-994, 2007.

SCHLOTTFELDT, F. S.; TRAMONTIN, S. W.; NAPPI, B. P.; SANTOS, J. I. Reclassificação taxonomica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **J. Bras. Patol. Méd. Lab.**, v. 38, p. 199-204, 2002.

SILVA, J. O.; CANDIDO, R. C. Avaliação do sistema API 20 C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 261-263, 2005.

SINGH, S.; SINGH, N.; KOCHHAR, R.; MEHTA, S.K.; TALWAR, P. Contamination of an endoscope due to *Trichosporon beigelii*. **J. Hosp. Infect.**, v. 14, p. 49-53, 1989.

SPANIK, S.; KOLLAR, T.; GYARFAS, J.; KUNOVA, A.; KREMERY, V. Successful treatment of catheter-associated fungemia due to *Candida krusei* and *Trichosporon beigelii* in a leukemic patient receiving prophylactic itraconazole. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 14, p. 148-149, 1995.

STENDERUP, A.; SCHONHEYDER, H.; EBBESEN, P.; MELBYE, M. White piedra and *Trichosporon beigelii* carriage in homosexual men. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 24, p. 401-406, 1986.

STONE, J.; MANASSE, R. Pseudoepidemic of urinary tract infections due to *Trichosporon beigelii*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 10, p. 312-315, 1989.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. Taxonomic position of deep-seated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from trichosporonosis patients. **J. Med. Microbiol.**, v. 33, p. 1368-1370, 1995.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. Rapid detection of species of the opportunistic yeast *Trichosporon* by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1458-1460, 1998a.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. Identification of *Trichosporon asahii* by PCR based on sequences of the internal transcribed spacer regions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2742-2744, 1998b.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; ICHIKAWA, T.; IKEDA, R.; SHINODA, T. Isolation of *Trichosporon asahii* from environmental materials. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 27-30, 2000.

TABORDA, V.B.; TABORDA, P.R.; MCGINNIS, M.R. Constitutive melanin in the cell wall of etiologic agent of Lobo's disease. **Rev. Inst. Med. Trop. de Sao Paulo**, v. 41, p.9-12, 1999.

TEICHERT, U.; MECHLER, B.; MULLER, H.; WOLF, D. Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 16037-16045, 1989.

TARAZOOIE, B.; KORDBACHEH, P.; ZAINI, F.; ZOMORODIAN, K.; SAADAT, F.; ZERAATI, H.; HALLAJI, Z.; REZAIE, S. Study of the distribution of *Malassezia* species in

patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. **BMC Dermatol.**, v. 4, p. 1-6, 2004.

TARRANT, J. Organisms in a aspirate from an ulcerated mass: etiologic agent or mass-querade. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 34, p. 165-168, 2005.

TASHIRO, T.; NAGAI, H.; NAGAOKA, H.; GOTO, Y.; KAMBERI, P.; NASU, M. *Trichosporon beigeli* pneumonia in patients with hematologic malignancies. **Chest**, v. 108, p. 190-195, 1995.

THÉRIZOL-FERLY, M.; KOMBILA, M.; GOMEZ DE DIAZ, M.; DUONG, T. H.; RICHARD-LENOBLE, D. White piedra and *Trichosporon* species in equatorial Africa. I. History and clinical aspects: an analysis of 449 superficial inguinal specimens. **Mycoses**, v. 37, p. 249-253, 1994.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofugin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 3394-3400, 2002.

VASTA, S.; MENOZZI, M.; SCIME, R.; INDOVINA, A.; SPECIALE, A.; LIBERTI, G.; SPANO, C.; MAJOLINO, I. Central catheter infection by *Trichosporon beigeli* after autologous blood stem cell transplantation. A case report and review of the literature. **Haematologica**, v. 78, p. 64-67, 1993.

VON KONELL, G. **Caracterização fenotípica de amostras de *Trichophyton rubrum* isoladas de pacientes imunocomprometidos (portadores de HIV)**. 2002. 156f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

WALSH, T. J.; NEWMAN, K. R.; MOODY, M.; WHARTON, R. C.; WADE, J. C. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. **Medicine**, v. 65, p. 268-279, 1986

WALSH, T. J.; MELCHER, G. P.; LEE, J. W.; PIZZO, P. A. Infectious due to *Trichosporon* species: new concepts in mycology, pathogenesis, diagnosis and treatment. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 5, p. 79-113, 1993.

WALZMAN, M.; LEEMING, J.G. White piedra and *Trichosporon beigeli*: the incidence in patients attending a clinic in genitourinary medicine. **Genitourin. Med.**, v.65, p.331-334, 1989.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 3864-3866, 1994a.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3004-3007, 1994b.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3131-3136, 1995.

WARNOCK, D.W. Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 41, p. 95-105, 1998.

WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v.2, p.338-387, 1988.

WICKERHAM, L. J. The taxonomy of yeasts. **U. S. D. Tech. Bull. U. S. Dep. Agric.**, n. 1029, 1951.

YAMAMOTO, K.; MAKIMURA, K.; SUDO, T.; SHIBUYA, K.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. Experimental disseminated trichosporonosis in mice: tissue distribution and therapy with antifungal agents. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p. 411-418, 1997.

YOSHIDA, K.; ANDO, M.; SAKATA, T.; ARAKI, S. Environmental mycological studies on the causative agent of summer-type hypersensitivity pneumonitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.81, p. 475-483, 1988.

YOUNGCHIM, S.; MORRIS-JONES, R.; HAY, R.J.; HAMILTON, A.J. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.175-181, 2004.

ZAAS, A. K.; BOYCE, M.; SCHELL, W.; LODGE, B. A. MILLER, J. L.; PERFECT, J. R. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5233-5235, 2003.

UZUN, O.; ARIKAN, S.; KOCAGOZ, S.; SANCAK, B.; UNAL, S. Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University Hospital and effect of time of reading. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 38, p. 101-107, 2000.

ANEXOS

ANEXO A: Meio Agar Saboraud-dextrose (Difco[®])

Formulação:

Sabaraud-Dextrose.....	65 g
Água destilada.....	1000 mL

Preparo:

Dissolver 65g do meio desidratado em 1000mL de água destilada, aquecer até homogenizar. Distribuir de 3-5mL em tubos de ensaio. Autoclavar a 120 °C por 15 minutos. Inclinare os tubos e após mantê-los refrigerados.

ANEXO B: Meio Uréia de Christensen (1946)

Formulação

Meio Básico

Ágar-agar.....	20 g
Peptona.....	1 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5 g
Fenol vermelho.....	12 mg
Glicose.....	1 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	2 g
Água destilada.....	100 mL
Ajustar o pH para 6,8	

Solução de uréia

Uréia.....	2,2 g
Água destilada.....	11 mL

Preparo

Homogenizar e filtrar em membrana de sílica (Millipore® 0,22µm). Adicionar 2 mL de solução de uréia em 200mL do meio básico autoclavado e homogenizar. Distribuir 3 mL da solução final em tubos de ensaio esterilizados dentro do fluxo laminar.

ANEXO C: Meio para Fermentação de carboidratos

Formulação:

Azul de bromotimol.....	0,03 g
Extrato de levedura.....	2,7 g
Peptona.....	4,5 g
Água destilada.....	600 mL
Etanol a 95%.....	1,8 mL

Preparo:

Dissolver o extrato de levedura e a peptona em água destilada. Separadamente, dissolver completamente o azul de bromotimol em etanol. Adicionar o azul de bromotimol dissolvido à mistura inicial e homogenizar. Distribuir 3mL do meio em tubos de ensaio com tampa roscável contendo um tubo de Durhan na posição invertida. Autoclavar a 121 °C, por 15 minutos. Deixar esfriar. Adicionar a cada tubo de ensaio, com o meio para fermentação, 1,5mL de uma das soluções de açúcar utilizando pipetas estéREIS. Homogenizar. Coservar a 4 °C por até um mês.

ANEXO D: Meio Ágar-Fubá Tween 80 (LACAZ et al., 2002)

Formulação:

Fubá.....	40 g
Ágar.....	20 g
Tween 80.....	10 mL
Água destilada.....	1000 mL

Preparo:

Dissolver o ágar em 500mL de água e fundir aquecendo em banho-maria a 50 °C por 40 minutos. Em outro recipiente, adicionar o fubá aos 500mL restantes de água destilada e fundir em banho-maria a 50 °C por 45 minutos, aproximadamente. Filtrar em gaze dobrada, e papel de filtro, para maior limpidez do filtrado. Juntar as soluções de ágar e fubá e restaurar o volume inicial. Ajustar o pH a 6,6-6,8 e adicionar o Tween 80. Distribuir em tubos. Estabilizar em autoclave a 120° durante 20 minutos.

ANEXO E: Meio para Prova de Assimilação fontes de Carbono (Lodder; Kreger VanRij, 1970)

Formulação:

Sulfato de Amônio.....	5,0 g
Fosfato de Potássio Monobásico.....	1,0 g
Sulfato de Magnésio (7 H ₂ O).....	0,5 g
Ágar.....	20,0 g
Água destilada.....	1000 mL

Preparo:

Dissolver os sais e o ágar na água destilada e fundir em banho-maria a 50/C durante aproximadamente 40 minutos. Preparar alíquotas de 20mL em tubos de Falcon e esterilizar em autoclave a 120 °C durante 15 minutos.

ANEXO F: CHROMagar Candida (Difco®)

Formulação:

Peptona.....	10,2 g
Mistura cormogênica.....	22,0 g
Ágar.....	15,0 g
Cloranfenicol.....	0,5 g
pH 6,1	

Preparo:

Dissolver 47,7g do meio comercial desidratado em 1000ml de água destilada. Aquecer o meio à temperatura de 100 °C, agitando e aquecendo repetidas vezes até dissolver

completamente o agar. Esfriar o meio a 45°, misturar e distribuir em placas de Petri. Manter as placas no refrigerador e ao abrigo da luz.

ANEXO G: Meio teste de proteinases (RUCHEL et al., 1982)

Formulação:

Meio básico

Ágar.....	18 g
Água destilada.....	900 mL

Meio contendo fonte protéica

“Yeast Carbon Base”.....	11,7 g
Albumina bovina (fração V).....	2 g
Complexo polivitamínico (Protovit, Roche®).....	2,5 g
Água destilada.....	100 mL

Preparo:

O meio contendo fonte protéica deverá ser esterilizado por filtração (Milipore® 0,22µm), em seguida misture ao meio básico, já autoclavado (121 °C por 15 minutos) e mantido em banho-maria (50 °C). Distribua cerca de 20 mililitros por placa de petri.

ANEXO H: Meio teste de fosfolipase (PRICE et al., 1982)

Formulação:

Meio básico

Bacto peptona.....	10 g
Glicose.....	10 g
Cloreto de sódio.....	57,3 g
Cloreto de cálcio.....	0,55 g
Ágar.....	20 g
Complexo polivitamínico (Protovit, Roche®).....	2,5 mL
Água destilada.....	1000 mL

Preparo:

Em primeiro lugar, lave ovos em água corrente e mergulhe-os em uma solução 2% de álcool iodado durante 20 minutos. Em seguida, assepticamente, separe as gemas das claras, pese 40 mililitros e reserve em placas de petri esterilizadas. Após, prepare o meio básico, que deve ser autoclavado (121 °C por 15 minutos) e mantido em banho-maria (50 °C). Quando a temperatura estabilizar, adicione 40 mililitros de gema de ovo, homogeneíze e distribua cerca de 20 mililitros por placa de petri.

ANEXO I: Meio teste de lipase (MUSHIN et al., 1997)

Formulação:

Solução A

Peptona.....	10 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Cloreto de cálcio.....	0,1 g
Ágar.....	20 g
Água destilada.....	950 mL
Ajustar pH = 5,5	

Solução B

Tween 20.....	10 mL
Água destilada.....	40 mL

Preparo:

As soluções A e B devem ser autoclavadas separadamente (121 °C por 15 minutos), misturadas e distribuídas em placas de petri.

ANEXO J: Meio teste de DNase (LOPEZ-MARTINEZ et al., 1994)

Formulação:

Solução A

DNase tes ágar (Oxoid®).....	42 g
Cloranfenicol.....	0,1 g
Água destilada.....	1000 mL

Preparo:

O meio deverá ser autoclavado (121 °C por 15 minutos) e distribuído assepticamente em placas de petri.