Dulce Sachiko Yamamoto de Figueiredo

**Identificação fenotípica e molecular, perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e
detecção de glucuronoxilomanana em isolados clínicos de *Trichosporon***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia
Orientadora: Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Figueiredo, Dulce Sachiko Yamamoto de

Identificação fenotípica e molecular, perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e detecção de glucuronoxilomanana em isolados clínicos de *Trichosporon* / Dulce Sachiko Yamamoto de Figueiredo. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.

Orientadora: Gilda Maria Barbaro Del Negro.

Descritores: 1.*Trichosporon* 2.Leveduras 3.Técnicas de tipagem micológica/métodos 4.Fenótipo 5.Análise de sequência de DNA 6.Antifúngicos 7.Fatores de virulência 8.Glucuronoxilomanana

USP/FM/DBD-396/13

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com tricosporonose, sem os quais os estudos clínicos não seriam possíveis, espero que este trabalho possa auxiliar ou contribuir no tratamento e cura da doença para que seus índices de morbidade sejam reduzidos ao máximo.

AGRADECIMENTOS

Mencionar todas as pessoas às quais devo agradecimentos para a conclusão desse trabalho seria impossível, pois isso remeteria àqueles que auxiliaram na minha formação até o momento.

No entanto acredito que dentro destes três anos focados na formulação dessa dissertação algumas pessoas não poderiam faltar, seriam estas, primeiramente, meus pais, Alvaro e Youko, que me deram suporte para que eu pudesse me dedicar exclusivamente a minha formação; meu irmão Henrique que assim como meus pais, é um dos meus maiores exemplos de dedicação, esforço e superação. Também agradeço aos meus outros irmãos: Cristina, Vera, Alvaro e Renato, que me levam a momentos de reflexão sobre como agir no meu dia-a-dia.

Agradeço à minha avó Dolly que sempre me impressionou com seu vasto conhecimento sobre assuntos e ao meu avô Alberto [*in memoriam*], que, em conjunto com minha avó repassou tudo o que há de melhor dentro de cada membro da família.

Gostaria de agradecer a minha tia Akemi, que por mais ocupada que estivesse nunca se esqueceu de mim, sempre fazendo agrados dos quais eu raramente me lembro de ligar para agradecer, mas que certamente são reconhecidos e recebidos com muito carinho. E as minhas primas Márcia e Cristina que sempre ajudaram a minha mãe quando não possuo tempo disponível.

Agradeço às minhas cachorrinhas Mel e Liza (essa que já não se encontra mais entre nós), companheira de todas as horas que tiveram que aturar sono às claras devido minhas inspirações noturnas. Essas as quais sempre demonstraram a mais pura forma de amor incondicional e que acrescentam muito mais sabor à minha vida, mesmo nos dias mais amargos.

Também não poderia de incluir nesses agradecimentos os meus amigos e amigas por compreenderem minha indisponibilidade de horários para que pudéssemos colocar o papo em dia, mas que sempre mantiveram contato mesmo que fosse para matar a saudade somente pela internet ou telefone. Especialmente gostaria de mencionar minha amiga Karla que insistiu para que eu enviasse meu currículo aos LIMs de meu interesse na FMUSP e me ajudou a focar na pós-graduação assim que terminei a faculdade.

Da mesma forma agradeço aos professores Carlos P. Taborda, Gil Benard e Dra. Gilda M. B. Del Negro por me receberem de portas abertas no Laboratório de Micologia Médica (LIM 53) do IMTSP e que após um período de experiência me ofereceram a oportunidade de realizar esse trabalho. Gostaria de ressaltar o meu apreço pela Dra. Gilda por ter assumido a minha orientação, ensinando-me efetivamente como realizar pesquisa e por muitas vezes sendo mais atenciosa do que o de costume para orientadores.

Gostaria também de agradecer ao médico João Nóbrega A. Jr. que foi uma pessoa essencial para a realização desse trabalho, seja pela contribuição do tema e todo o suporte para o desenvolvimento dos experimentos ou pelo fornecimento de isolados do HC-FMUSP. Agradeço também as funcionárias do Setor de Microbiologia da DLC (HC-FMUSP): Adriana L. Motta e Maria Isabel C. Pinto que me ajudaram no teste de suscetibilidade comercial e na identificação pelo VITEK 2.

Ainda dentre os profissionais que foram imprescindíveis na execução do estudo estão os funcionários do Núcleo de Micologia do IAL-SP, principalmente as Dras. Márcia S. C. Melhem, Maria Walderez Szeszs pela transmissão dos conhecimentos em suscetibilidade e auxílio na interpretação dos resultados, à Dulcilena M. C. Silva pelos isolados e aos alunos Lucas e Tiago por me ajudarem na execução da técnica.

Também agradeço ao professor Márcio L. Rodrigues do Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana da UFRJ por ter me recebido, para a realização dos ensaios de GXM, principalmente por suas alunas, as Dras. Fernanda L. Fonseca e Priscila C. Albuquerque que me ajudaram por todo o período, assim como todos os outros alunos que foram extremamente amigáveis e carinhosos fazendo com que eu não me sentisse deslocada por estar longe de casa.

Outras pessoas que contribuíram com esse trabalho foram a Dra. Thelma S. Okay e equipe do Laboratório de Soro-epidemiologia do IMTSP por permitirem o uso de seus equipamentos sempre que necessário. Também agradeço ao Dr. Ulysses D. Filho do Instituto da Criança do HC pela contribuição nas análises estatísticas.

Agradeço também às agências de fomento: FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Descrição do gênero <i>Trichosporon</i>	1
1.2 Histórico	2
1.3 Fatores de virulência.....	3
1.4 Manifestações clínicas.....	5
1.4.1 Colonização	5
1.4.2 Infecções superficiais	6
1.4.3 Infecções invasivas	6
1.5 <i>Trichosporon</i> no Brasil	7
1.6 Diagnóstico clínico e laboratorial de infecções por <i>Trichosporon</i> spp.	8
1.7 Tratamento.....	9
1.8 Teste de suscetibilidade a antifúngicos	10
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Isolados e cepas ATCC de <i>Trichosporon</i> spp.	14
4.2 Avaliação da pureza dos isolados.....	14
4.3 Identificação fenotípica dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. pelas características morfológicas.....	15
4.3.1 Estudo macromorfológico	15
4.3.2 Estudo micromorfológico	15
4.4 Caracterização do perfil bioquímico dos isolados	15
4.4.1 Hidrólise da uréia.....	15
4.4.2 Assimilação de carboidratos	16
4.4.3 Testes de sensibilidade à temperatura e tolerância à cicloheximida	16
4.5 Identificação dos isolados de <i>Trichosporon</i> por técnicas moleculares.....	16

4.5.1 Extrações de DNA dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.	16
4.5.2 Primers e condições de amplificação por PCR.....	17
4.5.3 Detecção do material amplificado por PCR	18
4.5.4 Sequenciamento automatizado dos produtos de PCR	18
4.6 Testes de suscetibilidade in vitro aos antifúngicos.....	18
4.6.1 Microdiluição em caldo - EUCAST	19
4.6.2 Microdiluição em caldo - <i>Sensititre YeastOne</i>	20
4.6.3 Análises comparativas entre os testes de suscetibilidade	20
4.7 Detecção da GXM na parede celular dos isolados de <i>Trichosporon</i>	22
4.8 Análises estatísticas	23
5. RESULTADOS	23
5.1 Isolados de <i>Trichosporon</i> spp. avaliados no estudo	23
5.2 Avaliação da pureza dos isolados	24
5.3 Identificação fenotípica dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. pelas características morfológicas.....	24
5.3.1 Estudo macromorfológico	24
5.3.2 Estudo micromorfológico	25
5.4 Caracterização do perfil bioquímico dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	26
5.4.1 Hidrólise da uréia.....	26
5.4.2 Assimilação de carboidratos	26
5.4.3 Testes de sensibilidade à temperatura e tolerância a cicloheximida	29
5.5 Identificação dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. por técnicas moleculares	30
5.5.1 Extração de DNA e detecção do material amplificado por PCR.....	30
5.5.2 Análise dos sequenciamentos	31
5.6 Testes de suscetibilidade in vitro aos antifúngicos.....	32
5.6.1 Microdiluição em caldo - EUCAST	32
5.6.2 Microdiluição em caldo - <i>Sensititre YeastOne</i>	33
5.6.3 Análises comparativas dos testes de suscetibilidade	34
5.7 Detecção da GXM na parede celular dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES.....	50
8. ANEXOS	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

C-G	Citosina-guanina
%	Porcentagem
<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
±	Mais ou menos
μL	Microlitro
μM	Micromolar
3/74	3 de 74
5FC	5-fluocitosina
ABD	Ágar batata dextrose
AFST	<i>Antifungal susceptibility testing</i>
AMB	Anfotericina B
ASD	Ágar Sabouraud dextrose
ATCC	American Type Culture Collection, USA
BSA	Soro albumina bovina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAS	caspofungina
CBS	<i>Centraal Bureau voor Schimmelcultures, The Netherlands</i>
células/mL	células por mililitro
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM 50%	Concentração inibitória mínima para 50% dos isolados
CIM 90%	Concentração inibitória mínima para 90% dos isolados
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CNM	<i>Spanish National Center of Microbiology</i>
CTZ	Cetoconazol
D1/D2	Região variável da subunidade 28S do DNA ribossomal
DLC	Divisão de Laboratório Central
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídios trifosfatados
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee for Antimicrobial Testing</i>
FCZ	Fluconazol
FDA	<i>Food and Drug Administration, USA</i>
GXM	Glucuronoxilomanana
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
IGS1	<i>Intergenic spacer 1</i>
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
ITZ	Itraconazol
Kb	Kilobase

KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LD	Baixa discriminação
mg/L	Miligrama por litro
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mM	Milimolar
MOPS	N-ácido morfolinopropanosulfônico
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
n°	Número
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PBS	Solução de fosfatos tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
POS	Posaconazol
rDNA	DNA ribossomal
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
spp.	Espécies
TA	Temperatura ambiente
Tris	Tris(hidroxiaminometano)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
U/mL	Unidade por mililitro
v/v	Volume a volume
VCZ	Voriconazol
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios interpretativos (<i>breakpoints</i>) estabelecidos para interpretação dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos para <i>Candida</i> spp., segundo o documento EUCAST <i>Antifungal Clinical Breakpoint Table</i> v. 6.1 (EUCAST, 2013).....	21
Tabela 2. Identificação de espécies dos 19 isolados invasivos de <i>Trichosporon</i> spp.. Resultados das análises pelo sistema VITEK 2, e por sequenciamentos das regiões IGS1 e D1/D2.....	27
Tabela 3. Identificação de espécies dos 55 isolados de <i>Trichosporon</i> spp. não invasivos. Resultados das análises pelo sistema VITEK 2 e por sequenciamentos da região IGS1.....	28
Tabela 4. Classificação dos 19 isolados de infecção invasiva em resistentes, intermediários e sensíveis, pelo método de referência EUCAST	32
Tabela 5. Classificação dos 55 isolados não invasivos em resistentes, intermediários e sensíveis (S) pelo método de referência EUCAST	32
Tabela 6. Classificação dos 19 isolados de infecção invasiva em resistentes, intermediários e sensíveis pelo método <i>Sensititre YeastOne</i>	33
Tabela 7. Classificação dos 55 isolados não invasivos em resistentes, intermediários e sensíveis pelo método <i>Sensititre YeastOne</i>	34
Tabela 8. Suscetibilidade (CIM em mg/L) das espécies de <i>Trichosporon</i> aos seis antifúngicos, determinada pelo método EUCAST.....	37
Tabela 9. Resultados das médias geométricas, modas, faixas de sensibilidade, e CIM 50% e 90%, para os 74 isolados de <i>Trichosporon</i> spp., obtidos pelo método EUCAST	38
Tabela 10. Resultados das médias geométricas, modas, faixas de sensibilidade, e CIM 50% e 90%, para os 74 isolados de <i>Trichosporon</i> spp., obtidos pelo método <i>Sensititre YeastOne</i>	38
Tabela 11. Percentuais de concordância essencial e discrepância observados para o teste <i>Sensititre YeastOne</i> em relação ao método EUCAST, para os 74 isolados de <i>Trichosporon</i> spp.	40
Tabela 12. Erros categóricos (%) observados na comparação do teste <i>Sensititre YeastOne</i> com o método de referência (EUCAST), para os 74 isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura da GXM em <i>C. neoformans</i> (A) e <i>T. asahii</i> (B), diferenciando-se pelo posicionamento da xilose na estrutura do polissacarídeo, e pelo número de unidades de manose (Fonseca <i>et al.</i> , 2009)	4
Figura 2. Aspectos da coloração do verso e anverso das colônias semeadas em CHROMagar <i>Candida</i> ® do isolado de <i>Trichosporon</i> sp. DLC 09	24
Figura 3. Aspectos macromorfológicos do verso de colônias dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. (DLC 03 e DLC 10), cultivados em AB por 24-48 horas	25
Figura 4. Aspectos micromorfológicos de isolados de <i>Trichosporon</i> spp. – Aumento 400x. Em A – a seta indica hifa verdadeira hialina; B - pseudo-hifas artrosporadas; C – seta indica blastoconídios	25
Figura 5. Géis de agarose a 1,5% mostrando bandas amplificadas por PCR com os primers 26F e 5SR (região IGS1) para alguns isolados do estudo. L= marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); R ⁻ e E ⁻ = controles negativos; C+ = controle positivo (DNA de <i>T. asahii</i> ATCC 90039); pb = pares de base.....	30
Figura 6. Géis de agarose a 1,5% mostrando bandas amplificadas pela PCR com os primers NL1 e NL4 (região D1/D2) para alguns isolados do estudo. L= marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); R ⁻ e E ⁻ = controles negativos; C+ = controle positivo (DNA de <i>T. asahii</i> ATCC 90039); pb = pares de base.....	30
Figura 7. Valores de CIM obtidos pelo método EUCAST para isolados de infecção invasiva e não invasivos, , após análise pelo teste de <i>Mann-Whitney</i> . (1) = isolados de infecção invasiva; (2) = isolados não invasivos; A: AMB = anfotericina B; B: CTZ = cetoconazol; C: 5FC = 5-fluocitosina; D: FCZ = fluconazol; E: ITZ = itraconazol; F: VCZ = voriconazol.....	35
Figura 8. Distribuição de isolados (invasivos e não invasivos) quanto ao tipo de resistência aos fármacos FCZ, VCZ e AMB: sensível e/ou intermediário (S+I); resistente a apenas um dos fármacos (R=1); resistência cruzada e múltipla (C+M) e resistência múltipla (M), com valores de CIM obtidos pelo método EUCAST.....	36
Figura 9. Diferenças entre CIMs obtidas pelos métodos EUCAST e <i>Sensititre</i> , após análise pelo teste de <i>Mann-Whitney</i> . (E) = EUCAST; (Y) = <i>Sensititre YeastOne</i> A: AMB = anfotericina B; B: CTZ = cetoconazol; C: 5FC = 5-fluocitosina; D: FCZ = fluconazol; E: ITZ = itraconazol; F: VCZ = voriconazol.....	39

Figura 10. Valores de **porcentagem de fluorescência** obtidos na marcação dos isolados de *Trichosporon* spp., cepas ATCC e *C. neoformans* H99, com o anticorpo monoclonal anti-GXM e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, por citometria de fluxo; (-) α -GXM = células não marcadas..... 41

Figura 11. Valores de **intensidade de fluorescência** obtidos para os isolados de *Trichosporon* spp., cepas ATCC e *C. neoformans* H99, por citometria de fluxo com anticorpo monoclonal anti-G e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo; (-) α -GXM = células não marcadas..... 41

RESUMO

FIGUEIREDO, D.S.Y. **Identificação fenotípica e molecular, perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e detecção de glucuronoxilomanana em isolados clínicos de *Trichosporon***. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Infecções invasivas por *Trichosporon* spp. ocorrem com maior frequência em pacientes neutropênicos, principalmente portadores de doenças hematológicas malignas, e estão associadas a elevados índices de mortalidade devido às dificuldades na identificação do patógeno e à resistência aos fármacos mais empregados na terapêutica antifúngica. A identificação das espécies de *Trichosporon* é importante tanto para estudos epidemiológicos, como para associar aspectos clínicos com as espécies causadoras das infecções. Além disso, auxilia no tratamento da enfermidade, uma vez que a suscetibilidades aos fármacos antifúngicos pode variar de acordo com a espécie. Além disso, as leveduras do gênero *Trichosporon* sintetizam a glucuronoxilomanana (GXM) em sua parede celular, que pode estar envolvida no mecanismo de virulência do patógeno.

Este estudo teve como objetivo determinar, por identificação fenotípica e molecular, espécies isoladas de pacientes internados em unidades hospitalares, comparando os resultados obtidos por ambos os métodos; avaliar diferenças na distribuição dessas espécies em relação às formas invasivas e não invasivas da infecção; determinar o perfil de suscetibilidade dessas leveduras aos antifúngicos, empregando um método de micro-diluição de referência e um método comercial; e avaliar a presença de GXM na parede celular dos isolados.

Foram avaliados 74 isolados obtidos de amostras clínicas de pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP e de outras unidades hospitalares do Estado de São Paulo, no período de 2003 a 2011. Dezenove amostras foram isoladas de sítios estéreis do organismo (infecções invasivas) e 55 foram isoladas de urina e cateter (isolados não invasivos). Para a identificação das espécies, os isolados foram submetidos a análises fenotípicas, que incluíram estudo macro e micromorfológico, provas fisiológicas e avaliação do perfil bioquímico por sistema automatizado VITEK 2. A identificação molecular foi realizada pelo sequenciamento das regiões IGS e D1/D2 do DNA ribossomal. O perfil de suscetibilidade dos 74 isolados foi analisado pelo método de micro-diluição EUCAST (referência) com os fármacos fluconazol (FCZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ), cetoconazol (CTZ), anfotericina B (AMB) e 5-fluocitosina (5FC); e pelo método de micro-diluição comercial *Sensititre YeastOne*, com os mesmos fármacos empregados no EUCAST, acrescidos do posaconazol (POS) e caspofungina (CAS). Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), erros categórico e essencial, bem como outros parâmetros foram comparados entre os dois métodos. A presença de GXM na parede celular dos 74 isolados foi determinada por citometria de fluxo, empregando anticorpo monoclonal anti-GXM.

Os resultados dos estudos morfológicos e fisiológicos foram insuficientes para definir as espécies dos 74 isolados. Pela assimilação de carboidratos analisada pelo sistema VITEK 2, verificou-se que 71 isolados foram identificados como *T. asahii* (17 de infecção invasiva e 54 não invasivos), um isolado como *T. mucoides* (invasivo), e para dois isolados (um invasivo e um não invasivo), a identificação não foi conclusiva. Para estes últimos foi realizado o auxanograma (método manual), e a identificação

permaneceu inconclusiva, pois pelo perfil de assimilação, os isolados poderiam ser identificados como *T. asahii* ou *T. faecale*. Pela técnica de sequenciamento, 62 dos 74 isolados foram identificados como *T. asahii*, demonstrando 82,4% de concordância com o sistema VITEK 2. Onze isolados com identificações discordantes pertenciam às espécies *T. inkin* (8), *T. faecale* (2) e *T. dermatis* (1), como determinado por sequenciamento. Dos dois isolados com identificação inconclusiva pelo VITEK 2, um foi identificado pela técnica molecular como *T. asahii*, enquanto para o outro isolado não foi possível definir a espécie. Portanto, dos 74 isolados do estudo, 62 foram identificados como *T. asahii*, 8 como *T. inkin*, 2 como *T. faecale* e 1 *T. dermatis*; dois isolados permaneceram sem identificação conclusiva.

Os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* mostraram que, em ambos os métodos, VCZ apresentou a melhor atividade antifúngica. Pelo método EUCAST, foram obtidos valores elevados de CIM para AMB, enquanto o mesmo não foi observado no teste comercial. Neste último, foram observados valores elevados de CIM para FCZ, POS e CAS. Em relação à 5FC, os valores de CIM 90% por ambos os testes foram elevados (16mg/L). Diferenças significantes foram observadas entre os valores de CIM obtidas pelos dois métodos, e percentuais relativamente elevados de erros categóricos graves quando o método comercial foi comparado ao de referência. Não houve diferença estatística significativa de valores de CIM entre isolados de infecção invasiva e não invasiva, exceto para ITZ e 5FC. Cerca de 30% dos isolados obtidos de casos de infecção invasiva e não invasivos apresentaram resistência cruzada entre os azóis FCZ e VCZ, e uma pequena porcentagem apresentou multirresistência.

Para a análise de GXM na parede celular dos 74 isolados do estudo, foi avaliada a intensidade de fluorescência emitida pela citometria de fluxo, não tendo sido observada diferença estatística significativa entre isolados invasivos e não invasivos. O estudo permitiu concluir que *T. asahii* foi a espécie mais isolada das amostras clínicas obtidas de sítios estéreis e não estéreis. A metodologia clássica de identificação fenotípica não foi suficiente para definir as espécies do gênero *Trichosporon*, e o sistema VITEK 2 apresentou discordância quando comparado à técnica molecular para as espécies não *T. asahii*. Em relação aos testes de suscetibilidade *in vitro*, VCZ apresentou-se mais adequado para a inibição das leveduras, enquanto os fármacos AMB, FCZ e POS não foram eficazes para a maior parte dos isolados. As discordâncias encontradas entre o método de referência e o comercial sugerem que, para o segundo, são necessárias mais avaliações para seu emprego em rotina laboratorial para o gênero *Trichosporon*. A detecção de GXM não resultou em diferenças entre os isolados de ambos os grupos; no entanto, para se determinar o efeito protetor do polissacarídeo contra a ação de macrófagos, ensaios de fagocitose devem ser realizados.

Descritores: *Trichosporon*; leveduras; técnicas de tipagem micológica/métodos; fenótipo; análise de sequência de DNA; antifúngicos; fatores de virulência; glucuronoxilomanana

SUMMARY

FIGUEIREDO, D.S.Y. **Phenotypic and molecular identification, antifungal susceptibility profile, and glucuronoxylomannan detection in *Trichosporon* clinical isolates.** [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Invasive *Trichosporon* spp. infections occur more frequently in neutropenic patients, especially those with hematologic malignancies, and are associated with high mortality rates due to difficulties in identifying the pathogen and treating patients with drugs most currently employed in antifungal therapy. *Trichosporon* species identification is important for epidemiological studies and to better define eventual species-specific clinical association. Additionally, antifungal susceptibility may vary according to the species. Furthermore, glucuronoxylomannan (GXM) is a cell wall-associated polysaccharide produced by genus *Trichosporon*, which may be involved in virulence mechanisms of this pathogen.

This study aimed (i) to identify *Trichosporon* species isolated from hospitalized patients by both phenotypic and molecular methods, comparing results; (ii) to verify the distribution of these species in invasive and non-invasive infection episodes; (iii) to determine the *in vitro* activities of various antifungals agents against the *Trichosporon* spp. isolates, employing a reference micro-dilution method and a commercial system; (iv) and to analyze the surface expression of GXM.

Seventy-four *Trichosporon* spp. isolates obtained from clinical specimens of patients admitted to the Hospital das Clínicas-FMUSP and to other hospitals in the state of São Paulo, from 2003 to 2011, were included in the study. Nineteen samples were isolated from sterile deep sites (invasive infections) and 55 were isolated from catheter and urine samples (non-invasive isolates). All isolates were submitted to phenotypic analysis, which consisted in morphological features observation, physiological tests and determination of the biochemical profile by VITEK 2 system. Molecular identification was performed by sequencing of IGS1 and D1/D2 regions from the ribosomal DNA. The susceptibility antifungal profiles of the 74 isolates were analyzed by both the EUCAST micro-dilution method (reference) employing fluconazole (FCZ), itraconazole (ITZ), voriconazole (VCZ), ketoconazole (CTZ), amphotericin B (AMB) and 5 - flucytosine (5FC), and the commercial micro-dilution test Sensititre YeastOne, with the same drugs employed in EUCAST plus posaconazole (POS) and caspofungin (CAS). The minimum inhibitory concentration values (MIC), categorical and essential errors as well as other susceptibility parameters were compared between both methods. The cell wall expression of GXM of all isolates was measured by flow cytometry employing an anti-GXM monoclonal antibody.

The morphological and physiological features of the *Trichosporon* spp. isolates were insufficient to define species. The carbohydrate assimilation analysis, performed by VITEK 2 system, has resulted in 71 isolates identified as *T. asahii* (17 from invasive infections and 54 non-invasive isolates) and one isolate as *T. mucoides* (invasive). The species identification for the two remaining isolates (one invasive and one non-invasive) was inconclusive. For this reason, a manual auxanogram was performed with these isolates, resulting again in non-conclusive species identification. By the automated sequencing method, 62 of the 74 isolates were identified as *T. asahii*, showing 82.4% of agreement with the VITEK 2 identification. Eleven isolates were identified by

sequencing as *T. inkin* (8), *T. faecale* (2) and *T. dermatis* (1), showing disagreement identification with the VITEK 2 system. Regarding the two isolates with inconclusive results by the carbohydrate assimilation, the molecular technique identified one as *T. asahii*, whereas for the other isolate the sequencing was also unable to define species. Therefore, among the 74 studied isolates, 62 were identified as *T. asahii*, eight as *T. inkin*, two as *T. faecale* and one as *T. dermatis*; and two isolates remained with inconclusive identification.

Almost all *Trichosporon* spp. isolates displayed susceptibility to VCZ with both methods. By the EUCAST method, high values of MIC were observed for AMB, while by the commercial test especially the invasive isolates showed susceptibility to this drug. Additionally, the Sensititre kit provided elevated MIC values for FCZ, POS and CAS. In regards to 5FC, the MIC 90% values were consistently high (16 mg/L) in both methodologies. The MIC values obtained by both EUCAST and commercial methods were compared, resulting in significant differences of MIC values for all tested antifungal drugs; major categorical errors occurred at relatively high percentage with the commercial method. No statistically significant differences in MIC values were verified when invasive and non-invasive isolates were compared. Around 30% of both invasive and non-invasive isolates showed cross-resistance to FCZ and VCZ, while a small number of isolates was multiresistant.

The GXM analysis by cytometry demonstrated no significant differences between invasive and non-invasive isolates.

This study demonstrated that *T. asahii* was the most frequently isolated species from both deep and non-sterile sites of the patients. The classical phenotypic methodology was not able to define *Trichosporon* species, and the VITEK 2 system identification showed disagreement with the sequencing technique for the non-*T. asahii* species. Regarding the *in vitro* susceptibility tests, VCZ was the most effective drug against the isolates, whereas most of them appear to be less susceptible to AMB, FCZ and POS. The discrepancies in the *Trichosporon* spp. susceptibility results between the reference and commercial methods suggest that the latter requires further evaluation tests before it can be used in routine laboratory. Although the GXM expression seemed to be equal in both invasive and non-invasive *Trichosporon* spp. isolates, phagocytic assays should be performed in order to determine the protective effect of the polysaccharide against phagocytosis.

Descriptors: *Trichosporon*; yeasts; mycological typing techniques/methods; phenotype; sequence analysis, DNA; antifungal agents; virulence factors; glucuronoxylomannan

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas a incidência de infecções fúngicas invasivas tem aumentado consideravelmente, contribuindo para a elevação dos índices de morbidade e mortalidade (Dasbach, Davies e Teutsch, 2000; Mcneil *et al.*, 2001; Pfaller e Diekema, 2007). O aumento no número de pacientes acometidos por doenças imunossupressoras, o uso de técnicas terapêuticas invasivas em unidades de cuidados intensivos, a utilização de antibióticos de amplo espectro em larga escala, o crescente número de transplantes hematológicos e de órgãos sólidos, entre outros, são fatores que contribuem para a ocorrência dessas infecções (Denning, 1998; Pfaller e Diekema, 2007; Upton *et al.*, 2007).

Entre os patógenos fúngicos oportunistas clássicos, as diferentes espécies de *Candida* constituem a quarta causa mais comum de infecções hematogênicas nosocomiais; *Aspergillus* spp. são os principais agentes que acometem pacientes transplantados de células hematopoiéticas, com elevados índices de mortalidade; e *Cryptococcus neoformans*, é o principal agente de meningites fúngicas em pacientes imunocomprometidos (Walsh *et al.*, 1990; Walsh *et al.*, 1992; Pfaller e Diekema, 2007).

Alguns fungos de baixa capacidade de invasão, têm se tornado cada vez mais frequentes em episódios de infecção sistêmica oportunística, sendo considerados como patógenos emergentes. Dentre estes, se destaca o gênero *Trichosporon*, por ser a segunda causa de infecções sistêmicas ocasionadas por leveduras em pacientes com doenças hematológicas malignas (Walsh *et al.*, 2004; Miceli, Díaz e Lee, 2011).

Vale ressaltar que infecções por fungos emergentes geralmente são difíceis de diagnosticar, resistentes a antifúngicos convencionais e apresentam elevados índices de mortalidade (Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008).

1.1 Descrição do gênero *Trichosporon*

As leveduras do gênero *Trichosporon* estão distribuídas em regiões de clima tropical e temperado, sendo geralmente isoladas de solo, água e madeira em decomposição; em relação ao homem, podem constituir a microbiota natural da pele, das unhas, da mucosa, do trato respiratório e digestivo (Nakagawa *et al.*, 2000; Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008; Lacasse e Cleveland, 2009).

Derivada do grego, a palavra *Trichosporon* é a combinação dos termos *trichos* que significa cabelo, e *sporon* que significa esporos. O gênero, assim como a espécie *Trichosporon beigelli*, foi originalmente descrito e recebeu tal denominação, pela visualização de nódulos nos pelos do corpo e cabelos dos pacientes (Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008). As leveduras deste gênero são classificadas como basidiomicetos (*Basidiomycota*, *Hymenomyces*, *Tremelloidae*, *Trichosporonales*) devido à similaridade da morfologia dos septos (dolíporos), relação percentual de citosina-guanina (C-G) e presença de xilose na parede celular (Guého, De Hoog e Smith, 1992; Lacaz *et al.*, 2009). Caracterizam-se fenotipicamente por formar blastoconídios, hifas e pseudo-hifas hialinas, e principalmente artroconídios; algumas espécies possuem outras estruturas morfológicas que permitem diferenciá-las das demais, tais como os apressórios, células fusiformes gigantes ou conidiação meristemática, e presença de parede celular multilamelar e dolíporos, com ou sem parentossomos; sua fase sexual ainda é desconhecida (Guého, De Hoog e Smith, 1992; Middelhoven, Scorzetti e Fell, 2004; Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008).

As colônias de *Trichosporon* spp. em ágar Sabouraud dextrose, apresentam-se com crescimento moderado, de 2 a 7 dias, de coloração creme, com ou sem cobertura esbranquiçada, podendo ser úmidas ou secas, e com aspecto cerebriforme e radial (De Hoog *et al.*, 2002). As espécies deste gênero são capazes de assimilar diferentes fontes de carboidratos, além de degradar a uréia, mas não são fermentadoras (Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008; Kurtzman e Fell, 2011).

1.2 Histórico

A primeira descrição de um isolado de *Trichosporon* spp. ocorreu em 1865, quando nódulos de *piedra* branca foram cultivados, e suas células foram observadas sob microscópio; no entanto, o agente etiológico foi incorretamente classificado como a alga *Pleurococcus beigelli*. Posteriormente, em 1890, Behrend descreveu em detalhes o fungo causador de *piedra* branca na barba de um homem, e o denominou *Trichosporon ovoides*; desde então, outras espécies de *Trichosporon* foram descritas. Em 1902, Vuillemin considerou que todas as espécies propostas até então eram apenas variações de uma única espécie de *Trichosporon*, a qual denominou de *T. beigelli* (Guého, De Hoog e Smith, 1992). A simplificação do gênero em apenas uma espécie deu-se principalmente pelo fato de que o método tradicional utilizado para classificar

taxonomicamente este gênero, era baseado somente na caracterização morfológica, ecológica e fisiológica. Isso levou ao agrupamento, no mesmo táxon, de isolados com características genéticas muito distintas (Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008).

Até a revisão proposta por Guého *et al.* (1992), o gênero *Trichosporon* abrangia poucas espécies. Através de técnicas moleculares, com análises de regiões do DNA ribossomal (DNAr), como as sequências intergênicas ITS (*internal transcribed spacer*) e IGS1 (*intergenic spacer 1*), bem como a região D1/D2 da subunidade 28S, o gênero passou por uma série de modificações taxonômicas, sendo descritas, atualmente, 50 diferentes espécies, divididas em cinco clados; destas, 16 são consideradas como de relevância médica, entre as quais: *T. asahii*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. dermatitis*, *T. faecale*, *T. jirovecii*, *T. mucoides*, *T. ovoides* e *T. loubieri* (Guého, De Hoog e Smith, 1992; Guého *et al.*, 1994; Sugita *et al.*, 1995; Sugita, Ikeda e Nishikawa, 2004; Sugita *et al.*, 2005; Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008; Pagnocca *et al.*, 2010; Colombo, Padovan e Chaves, 2011).

1.3 Fatores de virulência

Os fungos são patógenos oportunistas e possuem uma série de mecanismos que contribuem para sua disseminação no hospedeiro. Esses mecanismos são conhecidos como fatores de virulência, e podem estar relacionados a mudanças morfológicas, à capacidade de aderência a superfícies abióticas, termotolerância, expressão de componentes na parede celular e produção de enzimas (Hogan, Klein e Levitz, 1996; Jain, Hasan e Fries, 2008).

Estudos demonstram que espécies de *Trichosporon* são filogeneticamente relacionadas ao *C. neoformans*, e entre as características que se assemelham, está a capacidade de sintetizar a glucuronoxilomanana (GXM). Este polissacarídeo está associado à parede celular do *Trichosporon* spp. e também é excretado para o meio extracelular; é composto por blocos de hexassacárides similares à α -1,3-D-manana, com glicosilações nas posições O-2, O-4 e O-6 dos resíduos de manose (Guého *et al.*, 1993; Fonseca *et al.*, 2009).

A GXM sintetizada por *Trichosporon* spp. se assemelha à GXM encontrada na cápsula de *C. neoformans* (sorotipo A), diferenciando-se pelo posicionamento da xilose na estrutura do polissacarídeo, e pelo número de unidades de manose (**Figura 1**) (Ichikawa *et al.*, 2001; Karashima *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2009).

Figura 1. Representação da estrutura da GXM em *C. neoformans* (A) e *T. asahii* (B), diferenciando-se pelo posicionamento da xilose na estrutura do polissacarídeo, e pelo número de unidades de manose (Fonseca *et al.*, 2009)

A semelhança estrutural observada com a GXM de *Cryptococcus*, sugere que aspectos funcionais, incluindo antigenicidade e influência na interação do patógeno com as células do hospedeiro, possam ser semelhantes em *Trichosporon* spp. (Fonseca *et al.*, 2009). A GXM parece contribuir para a virulência do fungo, pois estudos com *Cryptococcus* demonstram que este polissacarídeo modula a resposta imune do hospedeiro, e protege a levedura da fagocitose e de danos oxidativos. No entanto, as funções da GXM na fisiologia e patogênese de *Trichosporon* spp. são ainda pouco conhecidas (Datta e Pirofski, 2006; Kanafani e Perfect, 2008; Vandeputte *et al.*, 2008).

Lyman e Walsh (1994), relataram em seus estudos, que isolados de *C. neoformans* e de *T. asahii* demonstraram maior resistência à fagocitose quando comparadas com cepas de *Candida*. A mesma evidência foi observada por Fonseca *et al.* (2009), ao observarem que células mutantes de *C. neoformans* sem cápsula, em contato com sobrenadantes contendo GXM de *T. asahii*, adquiriram maior resistência à ação de macrófagos do que células sem a presença do polissacarídeo. Outros autores observaram que uma produção mais significativa de GXM ocorria em isolados de *Trichosporon* spp. obtidos de infecções invasivas (Lyman *et al.*, 1995). Outro estudo,

envolvendo reinoculações sucessivas e recuperação de um isolado de *T. asahii* em camundongos, resultou no aumento da síntese do GXM (Karashima *et al.*, 2002).

1.4 Manifestações clínicas

Por muitos anos, o gênero *Trichosporon* foi considerado um fungo sapróbio, ocasionalmente encontrado como agente etiológico de *piedra* branca, que é a forma de infecção mais comum (Guého, De Hoog e Smith, 1992; Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008; Tapia P, 2009; Vazquez, 2010). Entretanto, nos últimos anos, tem ocorrido um aumento do número de episódios de infecção invasiva causados por esse gênero, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

Os agentes etiológicos das micoses causadas por *Trichosporon* spp. variam de acordo com o tipo de infecção, sendo *T. asahii*, *T. mucoides* e *T. asteroides* mais associados a infecções sistêmicas; *T. cutaneum* aos casos de pneumonia alérgica, e *T. inkin*, *T. cutaneum*, *T. ovoides* e *T. loubieri* às infecções superficiais, em geral como *piedra* branca (Ando *et al.*, 1990; Guého *et al.*, 1994; Sugita, Ikeda e Nishikawa, 2004; Colombo, Padovan e Chaves, 2011).

1.4.1 Colonização

A capacidade de colonização por um microrganismo está diretamente relacionada à resistência que este possui em relação aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Diferenças estruturais e funcionais da pele influenciam na quantidade e tipos de microrganismos que fazem parte da microbiota de determinada região do corpo (Sidrim e Rocha, 2004). As leveduras do gênero *Trichosporon* são consideradas como parte da microbiota transitória normal da pele humana (Zhang *et al.*, 2011). Ellner *et al.* (1991) ao isolarem *Trichosporon* spp. de roupas íntimas demonstraram que o microclima estabelecido, principalmente na região crural, favorece a colonização humana.

Não há relatos de transmissão destas leveduras de homem a homem, revelando assim, a importância da interação entre o estado de portador e fatores predisponentes ao estabelecimento da doença (Silvestre Junior, 2009).

1.4.2 Infecções superficiais

A doença mais comum causada por *Trichosporon* spp. é a *piedra* branca, que é uma forma de infecção superficial e, em geral, se apresenta de forma assintomática, podendo eventualmente afetar a pele ao redor, por eritematose, lesões descamativas com aspecto úmido e pruriginoso, e os pelos também podem se tornar quebradiços (Guého, De Hoog e Smith, 1992; Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008; Tapia, 2009).

Outras infecções superficiais de pele e onicomicoses causadas por espécies de *Trichosporon*, particularmente por *T. cutaneum*, também são relativamente comuns (Guého, De Hoog e Smith, 1992; Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008; Tapia, 2009).

1.4.3 Infecções invasivas

Desde 1970, quando Watson e Kallichurum descreveram o primeiro caso de infecção invasiva por *Trichosporon* spp. (tricosporonose), o número de relatos vem aumentando significativamente (Hazen, 1995; Sugita, Ikeda e Nishikawa, 2004).

A tricosporonose, que pode se apresentar na forma localizada ou disseminada, acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, e geralmente é precedida por colonização do trato respiratório ou gastrointestinal. Os pacientes podem apresentar febre, múltiplas lesões cutâneas, comprometimento pulmonar, envolvimento neurológico e até mesmo choque séptico (Walsh *et al.*, 2004; Silvestre, 2009).

Fungemias por *Trichosporon* spp. ocorrem mais frequentemente em pacientes neutropênicos, portadores de doenças hematológicas malignas, como linfomas e leucemia; e pacientes transplantados, com destaque para os transplantes de medula óssea (Colombo, Padovan e Chaves, 2011). Há também relatos de pacientes imunossuprimidos, que apresentaram infecções por *Trichosporon* spp. associadas à cirurgia oftalmológica, a próteses, uso de drogas endovenosas, e diálise peritoneal (Mooty *et al.*, 2001).

Ruan *et al.* (2009) ao estudarem casos de tricosporonose, verificaram que a maioria das infecções (76%) era causada pela espécie *T. asahii*, 95% dos pacientes tinham recebido antibióticos antes da internação, 90% dos pacientes tinham cateter venoso central, e 58% eram portadores de neoplasia maligna. Raros casos de infecção sistêmica também foram relatados com outras espécies de *Trichosporon*, tais como *T. pullulans* e *T. loubieri* (Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008).

Os índices de mortalidade associados à tricosporonose podem atingir de 80 a 100% dos casos, principalmente em pacientes com neutropenia persistente. Diagnóstico tardio e tratamento inadequado estão entre os fatores que colaboram para os índices de mortalidade elevados (Moretti-Branchini *et al.*, 2001; Sugita *et al.*, 2001; Toriumi *et al.*, 2002).

1.5 *Trichosporon* spp. no Brasil

No Brasil, a maioria dos relatos sobre *Trichosporon* spp. está associada a infecções superficiais, sendo que o país é evidenciado como o local onde há o maior número de casos envolvendo *piedra* branca genital (Magalhães *et al.*, 2008). De acordo com Silvestre (2009), o pequeno número de relatos sobre infecções invasivas por *Trichosporon* spp. no Brasil pode estar relacionado não somente à baixa incidência da enfermidade, mas também por falhas no diagnóstico.

Moretti-Branchini *et al.* (2001) descreveram dois casos de tricosporonose em transplantados de medula óssea ocorridos no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Um dos pacientes apresentou cultura positiva para *T. inkin* e foi tratado com fluconazol, apresentando melhora; já o segundo paciente, teve a cultura positiva para *T. asahii*, foi tratado com anfotericina B, mas evoluiu para óbito.

Rodrigues *et al.* (2006), em estudo retrospectivo (1999-2005), apresentaram 22 casos clínicos de tricosporonose no Rio Grande do Sul, em pacientes portadores de insuficiência respiratória, câncer, diabetes, insuficiência renal crônica, cirrose e AIDS, tendo sido isolada, de todos os casos, somente a espécie *T. asahii*. Os pacientes foram tratados principalmente com anfotericina B e fluconazol. Dentre os 22 casos, nove apresentaram melhora, enquanto outros nove pacientes foram a óbito; para os demais pacientes a evolução da doença é desconhecida.

Isolados de *Trichosporon* spp., de infecção invasiva, analisados por Chagas-Neto (2007), ao serem identificados por técnicas moleculares, apresentaram maior prevalência de *T. asahii* (76%), seguida de *T. asteroides* (20%) e *T. dermatis* (4%). Do mesmo modo, Araujo Ribeiro *et al.* (2008) encontraram maior frequência de isolamento de *T. asahii* (43%), ao estudarem 21 isolados, tanto de sítios estéreis, como de sítios de colonização, de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

1.6 Diagnóstico clínico e laboratorial de infecções por *Trichosporon* spp.

O diagnóstico das infecções por *Trichosporon* spp. pode ser realizado a partir de culturas de urina, escarro, lavado bronco-alveolar, líquido peritoneal, LCR e tecidos; as hemoculturas são positivas nas formas disseminadas (Bentubo, 2008; Lacaz *et al.*, 2009). Não existem métodos sorológicos padronizados para o diagnóstico de infecções por *Trichosporon* spp.. A determinação de níveis séricos de β -1,3-D-glucana poderia ser utilizada para uma triagem diagnóstica, uma vez que o teste apresenta boa sensibilidade em episódios de infecção fúngica invasiva; entretanto, os resultados não são específicos, uma vez que a maior parte dos fungos possui este componente na parede celular (Odabasi *et al.*, 2004; Vazquez, 2010; Bašková e Buchta, 2012). Além disso, há um relato de utilização do teste em pacientes portadores de fungemia por *Trichosporon* spp. no Japão, com resultados positivos em apenas 50% dos casos, demonstrando que a detecção deste componente não parece ser útil nessa infecção (Colombo, Padovan e Chaves, 2011).

A dificuldade de se estabelecer o diagnóstico nos casos de tricosporonose se deve ao fato de que sua manifestação clínica é semelhante a outras infecções fúngicas invasivas, como a candidíase sistêmica (Vazquez, 2010). Além disso, resultados falso-positivos em testes de aglutinação de partículas de látex para *Cryptococcus* podem ocorrer, quando amostras de soro de pacientes infectados pelas *Trichosporon* spp. são analisadas (Melcher *et al.*, 1991).

Após isolamento do patógeno em meios de cultura, a identificação de gênero e espécie pode ser realizada por métodos fenotípicos, que consistem em avaliar estruturas e características morfológicas, bem como o perfil bioquímico dos isolados; em geral são os mais empregados em laboratórios de rotina, mas apresentam limitações quanto à identificação da maior parte das espécies (Guého, De Hoog e Smith, 1992; Sugita *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 2004). Sistemas comerciais também são utilizados em rotina laboratorial para a identificação fenotípica de *Trichosporon* spp., tais como os sistemas não automatizados [API 20C AUX (BioMérieux); ID 32C (BioMérieux) e *RapID Yeast Plus System* (Innovative Diagnostic System)]; e os automatizados [VITEK™ System® (BioMérieux) e *Yeast Identification Panel* (Baxter MicroScan)] (Espinel-Ingroff, 1998; Ramani *et al.*, 1998; Colombo, Padovan e Chaves, 2011). Entretanto, nesses sistemas a identificação das espécies é incompleta, pois os bancos de dados e chaves

classificatórias dos mesmos contemplam poucas espécies do gênero *Trichosporon* (Chagas-Neto, 2007).

Como os métodos tradicionais de identificação fenotípica revelam resultados inconsistentes, as técnicas moleculares têm sido empregadas para auxiliar na determinação das mesmas (Araujo Ribeiro *et al.*, 2008; Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008). A maioria dos métodos moleculares utilizados são baseados em ampliações do material genômico com sondas específicas ou *primers* direcionados para regiões do rDNA (Chen *et al.*, 2001; De Baere *et al.*, 2002).

A identificação molecular de *Trichosporon spp.* foi inicialmente baseada na variabilidade de sequências das regiões ITS 1 e ITS 2 do rDNA; no entanto, estudos demonstraram que algumas espécies apresentam menos de 1% de diferença nessas sequências, não permitindo muitas vezes a diferenciação filogenética entre elas (Sugita *et al.*, 2002; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005). Análises das sequências da região IGS1 do rDNA com 1110 pares de base, bem como da região D1/D2 (663 pares de base) da subunidade 28S, têm sido empregadas como alternativa para a distinção entre espécies filogeneticamente muito próximas (Kurtzman e Robnett, 1997; Sugita *et al.*, 2002).

Outros métodos de identificação para definir espécies, incluem a citometria de fluxo baseada na tecnologia do tipo LUMINEX (Roche Diagnostics) e a espectrometria de massa pelo sistema MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*). Tais metodologias, entretanto, têm sido mais empregadas em laboratórios de pesquisa devido ao custo relativamente elevado dos equipamentos (Diaz e Fell, 2004; Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008).

1.7 Tratamento

Apesar da atual relevância do gênero *Trichosporon* na área clínica, o tratamento direcionado a pacientes com tricosporonose ainda necessita de aprimoramento. Mesmo com a expressiva quantidade de relatos sobre a resistência das infecções por *Trichosporon spp.* à terapêutica antifúngica, há poucos dados disponíveis na literatura sobre avaliação da suscetibilidade *in vivo* e *in vitro* aos fármacos antifúngicos (Colombo, Padovan e Chaves, 2011). A maior parte dos fármacos é utilizada de modo empírico, com diferentes resultados, dificultando a escolha do antifúngico ideal para o tratamento das infecções invasivas (Salazar e Campbell, 2002).

Equinocandinas e anfotericina B são antifúngicos efetivos contra um largo espectro de fungos agentes de micoses sistêmicas oportunistas; no entanto, anfotericina B demonstra baixa atividade fungicida contra *Trichosporon* spp., sendo a suscetibilidade *in vitro* muito variável. Do mesmo modo, as equinocandinas são ineficazes no tratamento das tricosporonoses (Colombo, Padovan e Chaves, 2011; Liao *et al.*, 2012). Alguns estudos clínicos e de suscetibilidade *in vitro* sugerem a utilização dos azóis, particularmente fluconazol, voriconazol e posaconazol (Fournier *et al.*, 2002; Asada *et al.*, 2006; Matsue *et al.*, 2006; Ruan, Chien e Hsueh, 2009). A utilização de terapêutica combinada nessas infecções ainda é pouco conhecida (Paphitou *et al.*, 2002; Vazquez, 2010; Miceli, Díaz e Lee, 2011).

1.8 Teste de suscetibilidade a antifúngicos

A metodologia de referência utilizada para realizar os testes de suscetibilidade para leveduras é a microdiluição em caldo proposta pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), que tem nos documentos da série M27-A a descrição de todos os procedimentos para testes com *Candida* e *Cryptococcus* (Revankar *et al.*, 1998; Cuenca-Estrella e Rodríguez-Tudela, 2001; Rex *et al.*, 2001). Para o gênero *Trichosporon* não existe ainda uma proposta e, por este motivo, são usados os mesmos procedimentos e critérios de interpretação dos valores obtidos para os testes com *Candida* (Arikan e Hasçelik, 2002). A última versão do documento foi publicada em 2008 (M-27-A3), e um suplemento desta versão foi divulgado em dezembro de 2012, incluindo os valores de CIM para voriconazol e caspofungina (CLSI, 2008b; 2012). A metodologia apresenta como principais limitações a liberação de resultados após 48 horas de incubação e leitura visual que, por ser subjetiva, pode acarretar em erros na determinação das CIM, particularmente no caso dos azóis, que são drogas fungistáticas (Motta, 2009; Colombo, Padovan e Chaves, 2011).

Em 2002, a Sociedade Europeia de Microbiologia criou uma comissão para a padronização de testes de suscetibilidade aos antifúngicos (*Antifungal Susceptibility Testing-European Committee for Antimicrobial Testing* – AFST-EUCAST). A comissão propôs modificações para a metodologia, entre as quais a adição de 2% de glicose ao meio de cultura, inóculo com maior concentração de células de leveduras e determinação de CIM através de leitura em 24 horas por espectrofotometria; o último documento com as recomendações atualizadas foi divulgado em 2012 - E.Def. 7.2

(Arendrup *et al.*, 2012). Os métodos CLSI e EUCAST têm demonstrado boa concordância de resultados e reprodutibilidade interlaboratorial; deste modo, os testes são considerados equivalentes e ambos são empregados como referência para a determinação da suscetibilidade *in vitro* para isolados de leveduras (Cuenca-Estrella *et al.*, 2002).

Os métodos de microdiluição de referência são trabalhosos e exigem laboratórios especializados, tanto para a realização dos testes, como para a interpretação dos resultados, dificultando seu emprego em laboratórios de rotina clínica. Testes desenvolvidos por empresas especializadas, e comercialmente disponíveis, têm sido avaliados e comparados às metodologias de referência, com resultados satisfatórios. O sistema de gradiente de difusão em ágar Etest (AB Biodisk) e o método de microdiluição colorimétrico *Sensititre YeastOne*® (Trek) são exemplos de testes comerciais, que foram validados e aprovados pelo FDA nos EUA (Chryssanthou, 2001; Morace *et al.*, 2002; Cantón *et al.*, 2006; Magill *et al.*, 2006; Alexander *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que a atividade *in vitro* dos diferentes antifúngicos contra espécies do gênero *Trichosporon* resulta em valores baixos de CIM para a maioria dos azólicos, e elevados para anfotericina B e 5-fluocitosina. As equinocandinas apresentam pouca atividade antifúngica *in vitro* para este gênero (Walsh *et al.*, 1990; Kanafani e Perfect, 2008; Vandeputte *et al.*, 2008).

Entretanto, variação no perfil de suscetibilidade tem sido demonstrada de acordo com a espécie de *Trichosporon*. García-Martos *et al.* (2001) verificaram que isolados de *T. mucoides* foram resistentes à anfotericina B, enquanto isolados de *T. cutaneum* demonstraram sensibilidade para este fármaco, e também para fluconazol, itraconazol, cetoconazol e 5-fluocitosina.

Chagas-Neto *et al.* (2008), ao estudarem o perfil de suscetibilidade de *Trichosporon* spp. isolados do sangue em cinco hospitais de São Paulo, encontraram valores de CIM elevados ($\geq 2\text{mg/L}$) para anfotericina B frente a 47% das amostras de *T. asahii*; no mesmo estudo, foram observados valores baixos ($\text{CIM} \leq 0,06\text{mg/L}$) para voriconazol, demonstrando boa atividade antifúngica deste fármaco. Outros autores relataram valores elevados de CIM para anfotericina B, como também para fluconazol, itraconazol e 5-fluocitosina frente a isolados de *T. asahii* (Wolf *et al.*, 2001; Paphitou *et al.*, 2002; Makimura *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Trichosporon spp. são considerados patógenos emergentes e de difícil identificação. No Brasil, há poucos relatos sobre quais espécies estão mais envolvidas em episódios de infecção invasiva e sua associação com os quadros clínicos dos pacientes afetados. Os métodos moleculares constituem uma alternativa para a correta identificação das espécies do gênero *Trichosporon*, uma vez que os métodos fenotípicos apresentam limitações. Como os pacientes acometidos pela infecção apresentam quadros clínicos graves, a definição rápida e precisa das espécies permite a administração precoce da terapia. Do mesmo modo, estudos sobre a suscetibilidade dessas espécies aos agentes antifúngicos podem contribuir para a definição da terapia antifúngica adequada nos casos de infecção sistêmica. Avaliações de componentes do fungo que possam estar relacionados a processos de invasão no hospedeiro podem trazer informações relevantes para a patogenia da tricosporonose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar as metodologias fenotípicas e moleculares para a identificação de espécies de *Trichosporon*, determinar o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e detectar GXM na parede celular de isolados obtidos de casos de infecção invasiva e de processos não invasivos.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Determinar, por identificação fenotípica e molecular, as espécies de *Trichosporon* de isolados invasivos e não invasivos obtidos de pacientes internados em unidades hospitalares do Estado de São Paulo, comparando os resultados obtidos por ambas as técnicas;

3.2.2 Avaliar a suscetibilidade *in vitro* dos isolados aos fármacos fluconazol, itraconazol, voriconazol, cetoconazol, anfotericina B e 5-fluocitosina pelo método de referência EUCAST; e por um sistema comercial (*Sensititre YeastOne*) com os mesmos fármacos, acrescidos de posaconazol e caspofungina, comparando resultados entre os dois métodos e entre os dois grupos de isolados;

3.2.3 Detectar, por citometria de fluxo, a presença de GXM na parede celular das leveduras, comparando resultados entre os isolados invasivos e não invasivos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados e cepas ATCC de *Trichosporon* spp.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Protocolo nº 0776/10) (**Anexo A**), bem como pela Comissão de Ética e Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (Protocolo nº 034/2011).

Os isolados de *Trichosporon* spp. foram obtidos de amostras clínicas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP) e em outras unidades hospitalares do Estado de São Paulo, no período de 2003 a 2011. Esses isolados eram mantidos congelados (-80°C), desde o momento do isolamento, no Setor de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central (DLC) do HC-FMUSP e no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Foram obtidos 21 isolados de sangue, ossos, líquido peritoneal, líquido e tecido subcutâneo (isolados invasivos), e 56 amostras isoladas de urina e de cateter (isolados não invasivos) (**Anexo B**).

Foram incluídas no estudo três cepas de referência: *Trichosporon asahii* (ATCC90039), *T. inkin* (ATCC18020) e *T. mucoides* (ATCC204094), para serem utilizadas como controles das análises realizadas.

4.2 Avaliação da pureza dos isolados

Para descartar uma possível contaminação por outros gêneros de leveduras, principalmente *Candida* spp., todos os isolados foram semeados em meio cromogênico seletivo CHROMagar *Candida*® (Becton Dickinson) para certificação da pureza dos cultivos mantidos nas coleções de culturas. Após 48 horas de incubação a 30°C, foram selecionadas as colônias que apresentaram a mesma coloração, sendo estas posteriormente cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) (Difco), para as próximas etapas de identificação. Isolados que apresentaram colônias de coloração atípica ou mistas, cuja purificação não foi possível, foram descartados do estudo.

4.3 Identificação fenotípica dos isolados de *Trichosporon* spp. pelas características morfológicas

4.3.1 Estudo macromorfológico

Análises de macromorfologia foram realizadas pela obtenção de colônias crescidas em placas contendo ágar batata dextrose (ABD) a 30°C, em estufa de incubação (Fanem). Foram analisados os aspectos de relevo, cor e textura das colônias.

4.3.2 Estudo micromorfológico

A partir das culturas em ASD a 30°C, foram preparados cultivos em lâmina para a observação das estruturas de conidiogênese, úteis para a identificação de algumas espécies de *Trichosporon* (Lacaz *et al.*, 2009). Com auxílio de alças descartáveis, pequenas porções das colônias foram semeadas em lâminas para microscopia, recobertas com ágar fubá (Difco) suplementado com 1% de Tween 80 (P1754, Sigma), e em lâminas com ágar malte (Difco) a 2%; as lâminas foram colocadas em placas de Petri 90x15mm, com papel de filtro umedecido com água estéril e, após vedação com papel tipo *Parafilm*, foram incubadas a 30°C por um período de 3 a 7 dias. As lâminas foram então observadas em microscópio óptico (Nikon) para a visualização de blastoconídios, hifas hialinas, artroconídios e células apressórias (De Hoog *et al.*, 2002; Sidrim e Rocha, 2004; Lacaz *et al.*, 2009).

4.4 Caracterização do perfil bioquímico dos isolados

4.4.1 Hidrólise da uréia

Os isolados foram submetidos ao teste de produção de urease, por crescimento em meio ágar uréia de Christensen (Difco), contendo vermelho de fenol como indicador. A hidrólise da uréia foi observada pela mudança da coloração resultante da alcalinização do meio, do amarelo para róseo intenso (Sidrim e Rocha, 2004; Lacaz *et al.*, 2009). As cepas de referência de *T. asahii*, *T. inkin* e *T. mucoides* foram empregadas como controles positivos e, como controle negativo, uma cepa de *C. albicans* ATCC64548 (levedura não produtora de urease).

4.4.2 Assimilação de carboidratos

Para os testes de assimilação de carboidratos, foi utilizado o sistema de identificação de leveduras semi-automatizado VITEK™ 2 (BioMérieux).

De acordo com o manual do fabricante, o sistema diferencia três espécies de *Trichosporon*, a saber: *T. asahii*, *T. inkin* e *T. mucoides*. As identificações finais são expressas em percentuais de concordância com os padrões inseridos no banco de dados do equipamento. Deste modo, na faixa de 96 a 99% a concordância é excelente; entre 93 e 95% muito boa; de 89 a 92%, boa concordância, e aceitável entre 85 e 88%.

Para a realização deste teste, foram preparadas suspensões dos isolados na escala 2.0 de McFarland, com auxílio de um turbidímetro *Densicheck* (BioMérieux), em tubos de ensaio contendo 3 mL de solução salina estéril (0,45-0,5% de NaCl). Os tubos contendo as suspensões e as cartelas de identificação contendo os açúcares foram colocados no *cassete* do equipamento VITEK 2 e mantidos por 18 horas. Após este período, os registros de identificação das espécies foram impressos. Somente foram aceitas identificações entre excelente e boa, ou seja, com faixas de concordância até 89%. Nos casos em que a faixa foi inferior, o teste foi repetido.

4.4.3 Testes de sensibilidade à temperatura e tolerância à cicloheximida

Testes adicionais foram realizados com todos os isolados, tais como a capacidade de crescimento a 37°C, 40°C e 42°C; e a tolerância à presença de cicloheximida (C7698, Sigma), nas concentrações de 0,1% e 0,01% no meio ASD. Os resultados obtidos nestes testes foram comparados aos parâmetros fisiológicos descritos nas chaves de classificação de leveduras (De Hoog *et al.*, 2002; Kurtzman e Fell, 2011).

4.5 Identificação dos isolados de *Trichosporon* spp. por técnicas moleculares

4.5.1 Extrações de DNA dos isolados de *Trichosporon* spp.

As extrações de DNA foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Van Burik *et al.* (1998), com algumas modificações. As suspensões foram centrifugadas a 13500 rpm por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e aos *pellets* foram adicionados 600 µL de solução Tris-EDTA (50mM-10mM), 250 U/mL da enzima liticase (L4276, Sigma) e 2,5% de β-mercaptoetanol (Merck). Os tubos foram

mantidos em banho seco a 37°C por 2 horas e meia para digestão da parede celular; em seguida, foram adicionados 0,2% de SDS (Sigma) e 200 mg/L de proteinase K (Sigma) e, após homogeneização em agitador tipo vórtex, as amostras foram mantidas em banho seco a 65°C por 45 minutos, para lise celular e digestão proteica. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos, os sobrenadantes transferidos para tubos limpos e isopropanol (Merck) foi adicionado v/v; os tubos foram mantidos a -20°C *overnight*, e centrifugados a 13500 rpm por 20 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e aos *pellets* foram adicionados 500 µL de etanol a 70%; os tubos foram novamente centrifugados a 13500 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes descartados. Os tubos foram então mantidos em banho seco a 70° C por 30 minutos para total evaporação do etanol. O material contendo o DNA foi eluído em 100 µL de Tris-EDTA (100mM-10mM), e alíquotas dessas amostras foram coletadas para se determinar a concentração em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo).

4.5.2 *Primers e condições de amplificação por PCR*

Para a identificação molecular das espécies de *Trichosporon*, foram selecionadas duas regiões do DNA ribossomal que apresentam sequências variáveis: a região IGS1 e a região D1/D2. Para os 19 isolados invasivos, foram realizados os sequenciamentos das duas regiões; e para os isolados não invasivos, a região D1/D2 foi analisada somente para os casos em que, após as reações de sequenciamento na região IGS1, a identidade entre as sequências desses isolados e aquelas disponíveis no banco genômico do *Fungal Biodiversity Center – Centraal Bureau voor Schimmelcultures, The Netherlands* (CBS) e *GenBank* foi inferior a 97%, conforme recomendação do documento MM18-A (CLSI, 2008a).

As amplificações da região IGS1 foram realizadas em volume final de 50 µl de solução, contendo tampão da enzima 1x (Promega), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 0,4µM dos *primers* 26SF (5-ATCCTTTGCAGACGACTTGA-3') e 5SR (5'-AGCTTGACTTCGCAGATCGG-3'), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega) e 20ng de DNA obtidos dos isolados de *Trichosporon* spp.. As condições de amplificação foram: denaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 56°C e 1 minuto a 72°C, com extensão final de 5 minutos a 72°C (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Araujo Ribeiro *et al.*, 2008).

As amplificações da região D1/D2 foram realizadas nas mesmas condições, com os *primers* NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), com temperatura de hibridização de 52°C (Kurtzman e Robnett, 1997).

4.5.3 Detecção do material amplificado por PCR

A detecção dos amplificados foi realizada em géis de agarose (Invitrogen) na concentração de 1,5%, em cubas de eletroforese horizontal (Horizon 58, Biometra), com tampão TRIS-ácido acético-EDTA pH 8,0, a 80V por 40 minutos. Os géis foram corados com GelRed (Biotium), e os resultados registrados em sistema de fotodocumentação (Uvitec).

4.5.4 Sequenciamento automatizado dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação foram purificados com utilização do kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), de acordo com protocolo do fabricante, e posteriormente submetidos às reações de sequenciamento no equipamento *ABI 3730 DNA Analyser* (Life Technologies).

Para as reações de sequenciamento, aproximadamente 100 ng dos produtos purificados e 2,5 µL dos *primers forward* e *reverse* a 5µM, em tubos separados, foram enviados ao Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP.

As sequências foram analisadas, com auxílio do *software Sequence Scanner* v1.0 (Life Technologies), e foram alinhadas pelo programa *ClustalW2*. As sequências nucleotídicas consenso obtidas foram comparadas às sequências de cepas de *Trichosporon* spp. disponíveis no banco de dados da CBS e no *GenBank*. A identificação das espécies pelo método molecular somente foi considerada quando a identidade ficou acima de 97%, de acordo com recomendação do CLSI (MM18A - CLSI, 2008a).

4.6 Testes de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos

Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos foram realizados pelo método de referência de microdiluição em caldo, de acordo com os procedimentos descritos no documento EDef 7.2 do EUCAST (Arendrup *et al.*, 2012), para todos os isolados do estudo, bem como para as três cepas de referência de *Trichosporon* spp.. Para tanto,

foram avaliados os fármacos fluconazol (FCZ, Sigma), itraconazol (ITZ, Sigma), voriconazol (VCZ, Sigma), cetoconazol (CTZ, Nicholas Piramal, India), anfotericina B (AMB, Sigma) e 5-fluocitosina (5FC, Sigma).

Em relação ao sistema comercial *Sensititre YeastOne*® (YO8, Trek), foram avaliadas as suscetibilidades para oito fármacos: FCZ, ITZ, VCZ, CTZ, AMB, 5FC, posaconazol (POS) e caspofungina (CAS).

4.6.1 Microdiluição em caldo - EUCAST

Microplacas de 96 orifícios (Costar) foram preparadas para cada antifúngico. As soluções de trabalho foram obtidas por diluições seriadas das drogas em meio RPMI 1640 estéril (Cultilab), acrescido de 2% de glicose (Difco), e tamponado com MOPS (Sigma) para pH 7,0, até atingir concentração duas vezes superior à concentração final desejada para as avaliações da sensibilidade. As concentrações finais dos fármacos, obtidas nos orifícios das placas, foram: 0,015 mg/L a 8 mg/L para ITZ, CTZ, VCZ e AMB; e 0,12 mg/L a 64 mg/L para FCZ e 5-FC. Os isolados foram, inicialmente, semeados em ASD e incubados por 24 horas a 30°C; suspensões (inóculos) foram preparadas na concentração relativa a escala 0,5 de McFarland, com auxílio do turbidímetro *Densicheck Plus* (BioMérieux). Cem microlitros dos inóculos foram distribuídos nos orifícios das microplacas contendo antifúngicos e nos orifícios controles positivos (sem antifúngico), e as placas foram mantidas em estufa a 35°C. As leituras do crescimento foram realizadas em leitor de placas modelo Multiskan MS (Labsystems), em comprimento de onda de 540 nm, após 24 e 48 horas de incubação, e os valores de densidade ótica foram registrados. Cepas de referência de *Candida parapsilosis* ATCC22019 e *Candida krusei* ATCC6258 foram empregadas como controles de sensibilidade e resistência, respectivamente. Para esta metodologia, os valores de CIM foram determinados pela menor concentração do antifúngico que inibiu 50% ou mais do crescimento das leveduras para os triazólicos e 5-fluocitosina, em comparação ao controle de crescimento positivo; para anfotericina B, a CIM foi determinada pela inibição total (100%) do crescimento.

Para os isolados que não apresentaram crescimento em até 48 horas, os testes foram repetidos, incubando-se as placas a 30°C com agitação de 350 rpm por 48 horas (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Zaragoza *et al.*, 2011).

4.6.2 Microdiluição em caldo - *Sensititre YeastOne*

Esta metodologia compreende um painel de diluição em caldo comercial, na qual as placas de microtitulação contêm um indicador colorimétrico de crescimento (azul de alamar) juntamente com os seguintes antifúngicos liofilizados, em diluições seriadas finais ($\log_2$): FCZ (0,125-256 mg/L); ITZ (0,008-16 mg/L); CTZ (0,008-16 mg/L); VCZ (0,008-16 mg/L); AMB (0,008-16 mg/L); 5FC (0,03-64 mg/L); POS (0,008-8 mg/L) e CAS (0,008-16 mg/L).

O procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante: isolados com crescimento de 24 horas em ASD a 30°C, foram suspensas em 5 mL de água destilada, até a obtenção do padrão 0,5 da escala de McFarland, correspondente a um inóculo de 1×10^7 a 1×10^8 leveduras/mL, ajustado com auxílio do turbidímetro Densicheck Plus. Foram coletados 20 μ L dessas suspensões, aos quais foram adicionados 11 mL do caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS (*Sensititre YeastOne*), resultando em soluções com inóculo final de 1,5 a 5×10^3 células/mL. Foram adicionados aos orifícios das microplacas, 100 μ L dos inóculos, e as placas foram incubadas a 35°C. Os resultados foram observados após 24 e 48 horas.

A CIM (mg/L) foi determinada pela menor concentração do antifúngico que inibiu o crescimento do micro-organismo, detectado visualmente pela mudança da cor rosa ou púrpura para a cor azul. A leitura dos painéis foi realizada por mais de uma pessoa, de forma independente, e quando ocorreram discrepâncias maiores que duas diluições, os testes foram repetidos.

4.6.3 Análises comparativas entre os testes de suscetibilidade

Uma vez que o método de referência (EUCAST) não inclui critérios interpretativos (*breakpoints*) para o gênero *Trichosporon*, neste estudo os valores de CIM utilizados foram baseados naqueles estabelecidos para o gênero *Candida*; do mesmo modo, avaliações em relação à categoria dos fármacos (sensível, intermediário e resistente), somente foram empregadas para os antifúngicos que possuem critérios interpretativos definidos, quais sejam: FCZ, VCZ, AMB e POS (**Tabela 1**).

Tabela 1. Critérios interpretativos (*breakpoints*) estabelecidos para interpretação dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos para *Candida* spp., segundo o documento EUCAST *Antifungal Clinical Breakpoint Table* v. 6.1 (EUCAST, 2013)

FÁRMACO	<i>Breakpoints</i> (mg/L)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Fluconazol	≤ 2	4	> 4
Itraconazol	-	-	-
Cetoconazol	-	-	-
Voriconazol	$\leq 0,12$	-	$> 0,12$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
5-Fluocitosina	-	-	-
Posaconazol	$\leq 0,06$	-	$> 0,06$
Caspofungina	-	-	-

(-) = critérios ainda não definidos

Os valores de CIM obtidos para os isolados de *Trichosporon* spp. invasivos e não invasivos foram comparados; para tanto, foram calculados os parâmetros: média geométrica, moda, faixa de sensibilidade e valores de CIM obtidos para 50% e 90% das amostras fúngicas. Valores de CIM foram também avaliados em relação às espécies de *Trichosporon*, de acordo as identificações determinadas pelo método molecular.

Os resultados obtidos pelo método EUCAST foram avaliados a fim de determinar se os isolados apresentavam resistência cruzada (resistência a dois ou mais fármacos da mesma classe) e/ou múltipla (entre fármacos de classes diferentes). Para esta análise, foram incluídos somente os resultados obtidos com os fármacos que possuem critérios interpretativos estabelecidos: FCZ, VCZ e AMB.

Para a comparação dos resultados entre os dois métodos (referência e comercial) foram realizadas análises de concordância essencial, pela qual são comparados os valores de CIM obtidos por ambos os testes, considerando equivalentes quando os resultados apresentam diferenças de ± 2 diluições (Pfaller *et al.*, 2010); e de concordância categórica, ou seja, comparando as categorias sensível, intermediário e resistente. Quando as categorias não foram concordantes, foram avaliados os tipos de erro: i) menor (sensível ou resistente pelo do método de referência e intermediário pelo método comercial, assim como resistente ou sensível pelo método comercial e intermediário para o método de referência), ii) grave (sensível pelo método de referência e resistente pelo método comercial) e iii) muito grave (resistente pelo método

de referência e sensível pelo método comercial) (Pfaller *et al.*, 2008). Para os cálculos dos erros categóricos foram utilizadas as fórmulas propostas pelo FDA (2009):

$$\begin{aligned}\text{Erro menor} &= \frac{(\text{n}^\circ \text{ de erros menores})}{\text{Total de isolados}} \times 100 \\ \text{Erro grave} &= \frac{(\text{n}^\circ \text{ de erros graves})}{\text{Total de isolados sensíveis pelo EUCAST}} \times 100 \\ \text{Erro muito grave} &= \frac{(\text{n}^\circ \text{ de erros muito graves})}{\text{Total de isolados resistentes pelo EUCAST}} \times 100\end{aligned}$$

4.7 Detecção da GXM na parede celular dos isolados de *Trichosporon* spp.

Os testes para detecção de GXM na parede celular dos isolados de *Trichosporon* spp., bem como para as cepas de referência *T. asahii* (ATCC90039), *T. inkin* (ATCC18020), *T. mucoides* (ATCC204094) e *Cryptococcus neoformans* (Broad Institute, USA - H99), foram realizados no Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana do Instituto de Microbiologia “Prof. Paulo de Góes” - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os isolados foram cultivados em tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 7 mL de caldo ASD, por 24 horas a temperatura ambiente (TA), sob agitação. Os cultivos foram lavados uma vez em meio mínimo, composto por dextrose (15 mM), MgSO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (29,4 mM), glicina (13 mM) e tiamina-HCl (3 µM), pH 5,5, e os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida, os lavados foram transferidos para novos tubos contendo 4 mL de meio mínimo, e mantidos por 72 horas (TA), sob agitação. Foram preparadas alíquotas de 1 mL de suspensão de leveduras, e essas foram lavadas em salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2). Em seguida, as células foram “fixadas” com 200 µL de paraformaldeído 4% por uma hora (TA), lavadas três vezes em PBS, sob centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos, e “bloqueadas” com 300 µL de soro albumina bovina a 1% em PBS (PBS-BSA 1%) a 4° C *overnight*. Após esse período, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-GXM IgG 18B7 (10 µg/mL em PBS-BSA 1%) por uma hora a 37° C, lavadas três vezes com PBS e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário IgG de camundongo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) a 1µg/mL, por uma hora a 37° C. As células foram novamente lavadas três vezes com PBS, submetidas às análises no citômetro de fluxo FACS (BD Biosciences) e

os dados foram processados pelo *software CellQuest* (BD Biosciences). Células de *Trichosporon* spp. e *C. neoformans*, não marcadas com o anticorpo IgG 18B7, porém incubadas com anticorpo secundário, foram utilizadas como controles dos testes.

O anticorpo monoclonal anti-GXM IgG 18B7 foi gentilmente cedido pelo Prof. Arturo Casadevall, Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Nova York, EUA.

Os dados gerados, a partir de leituras realizadas com 10^4 células das leveduras, foram analisados de duas maneiras: porcentagem de fluorescência (percentual de células de cada isolado “marcadas” pelo anticorpo anti-GXM) e intensidade de fluorescência (“conteúdo” de GXM expresso pelas células de cada isolado), cujos valores foram comparados aos controles negativos.

4.8 Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas para avaliar se ocorreram diferenças significantes em relação à suscetibilidade de isolados invasivos e não invasivos aos antifúngicos avaliados, bem como entre os métodos EUCAST e *Sensititre YeastOne*. As diferenças entre as intensidades de fluorescência para a detecção de GXM, dos isolados de ambos os grupos, também foram avaliadas por método estatístico. Para tanto, foram utilizados os programas MedCalc versão 12.7.4 e SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 13.0, e o teste aplicado foi o de Mann-Whitney. Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Isolados de *Trichosporon* spp. avaliados no estudo

Dos 77 isolados de *Trichosporon* spp. obtidos inicialmente (**Anexo B**), três foram descartados por apresentarem contaminação com outras leveduras (vide ítem **5.2**), resultando em 74 isolados avaliados no presente estudo. Foram considerados como invasivos 19 isolados (25,6%) obtidos de sítios estéreis: sangue (13), líquido peritoneal (2), osso (2), LCR (1) e tecido subcutâneo (1); e 55 amostras (74,4%) isoladas de sítios não estéreis como urina (54) e cateter (1), considerados como isolados não invasivos.

5.2 Avaliação da pureza dos isolados

Para descartar a possibilidade de contaminação dos isolados de *Trichosporon* spp. por bactérias e outros gêneros de leveduras, os mesmos foram incubados em meio CHROMagar *Candida*®. Dois isolados invasivos (DLC01 e DLC08, **Anexo B**) e um não invasivo (7B, **Anexo B**) apresentaram colônias de coloração rosa e/ou mista, não condizente com a literatura. O exame microscópico direto, assim como os cultivos em lâmina, apresentaram estruturas características de *Trichosporon* spp., mas também do gênero *Candida* sp. Tentativas de reisolamento de culturas puras não foram bem sucedidas, e os isolados foram excluídos do estudo. Os demais isolados apresentaram colônias puras, com verso azul ou roxo, de aspecto rugoso, e anverso verde azulado (**Figura 2**).

Figura 2. Aspectos da coloração do verso e anverso das colônias semeadas em CHROMagar *Candida*® do isolado de *Trichosporon* sp. DLC 09

5.3 Identificação fenotípica dos isolados de *Trichosporon* spp. pelas características morfológicas

5.3.1 Estudo macromorfológico

Todos os isolados do estudo, cultivados em AB, se desenvolveram no período de 24 a 48 horas, e suas colônias apresentaram coloração creme, sendo a maioria com cobertura esbranquiçada, secas e com aspecto superficial cerebriforme; apenas o isolado DLC10 apresentou-se com aspecto de colônia mucoide (**Figura 3**). Estes aspectos macromorfológicos das colônias são condizentes com as características descritas na literatura para o gênero *Trichosporon* (Kurtzman e Fell, 2011).

Figura 3. Aspectos macromorfológicos do verso de colônias dos isolados de *Trichosporon* spp. (DLC 03 e DLC 10), cultivados em ABD por 24-48 horas

5.3.2 Estudo micromorfológico

Tanto para os cultivos em ágar fubá suplementado com 1% de Tween 80, como em ágar malte a 2%, os resultados dos cultivos em lâmina demonstraram aspectos micromorfológicos semelhantes, com exceção dos isolados 1E e 2F (não invasivos), que apresentaram crescimento com ausência de estruturas indicativas de espécies do gênero *Trichosporon*. Nos demais isolados, foram observadas hifas hialinas, artroconídios e blastoconídios, confirmando o gênero *Trichosporon*. Entretanto, em nenhum caso observaram-se estruturas, como por exemplo, células apressórias (**Figura 4**).

Figura 4. Aspectos micromorfológicos de isolados de *Trichosporon* spp. – Aumento 400x. Em A – a seta indica hifa verdadeira hialina; B - pseudo-hifas artrosporadas; C – seta indica blastoconídios

5.4 Caracterização do perfil bioquímico dos isolados de *Trichosporon* spp.

5.4.1 Hidrólise da uréia

Após 48 horas de incubação à temperatura ambiente, todos os isolados do estudo apresentaram resultados positivos para hidrólise de uréia, parâmetro bioquímico característico do gênero *Trichosporon*; a análise dos resultados se deu pela observação da mudança de coloração do meio de cultura do amarelo para róseo.

5.4.2 Assimilação de carboidratos

O sistema VITEK 2 possibilitou identificações conclusivas para 18 dos 19 isolados invasivos, sendo 17 identificados como *T. asahii*, e um isolado como *T. mucoides*. Para o isolado cuja identificação não foi obtida (IAL 04), o teste foi repetido por mais duas vezes, mas a identificação permaneceu inconclusiva, pois o sistema identificou o isolado ou como *T. asahii*, ou como *T. inkin*, com valores percentuais semelhantes (**Tabela 2**).

Em relação aos isolados não invasivos, 54 foram identificados como *T. asahii* e apenas o isolado 3B apresentou “baixa discriminação” pelo VITEK 2 (**Tabela 3**).

Para os isolados que apresentaram resultados inconclusivos (IAL04 e 3B), foram realizados testes de assimilação de carboidratos pela metodologia clássica manual (auxanograma) com 15 açúcares; no entanto, os resultados obtidos não permitiram distinguir entre *T. asahii* e *T. faecale*, uma vez que estas espécies possuem perfis de assimilação semelhantes (Kurtzman e Fell, 2011).

Tabela 2. Identificação de espécies dos **19** isolados invasivos de *Trichosporon* spp.. Resultados das análises pelo sistema VITEK 2, e por sequenciamentos das regiões IGS1 e D1/D2.

Sigla	Espécies identificadas pelo sistema VITEK 2 *	Espécies identificadas por sequenciamento da região IGS1**	Espécies identificadas por sequenciamento da região D1/D2**
DLC 02	<i>T. asahii</i> (97%)	<i>T. inkin</i> CBS 5585 (80%) <i>T. inkin</i> CNM-CL6516 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 8640 (98,2%) <i>T. inkin</i> (100%) <i>T. ovoides</i> (100%)
DLC 03	<i>T. asahii</i> (95%)	<i>T. inkin</i> CBS 5585 (80%) <i>T. inkin</i> CNM-CL6516 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 8640 (98,2%) <i>T. inkin</i> (100%) <i>T. ovoides</i> (99,5%)
DLC 04	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
DLC 06	<i>T. asahii</i> (97%)	<i>T. inkin</i> CBS 5585 (80%) <i>T. inkin</i> CNM-CL6516 (100%)	<i>T. inkin</i> CBS 5585 (98,2%) <i>T. ovoides</i> (99,5%)
DLC 07	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (98%) <i>T. asahii</i> CNM-CL6502 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%) <i>T. asahii</i> CBS 8640 (100%)
DLC 10	<i>T. mucoides</i> (98%)	<i>T. dermatis</i> CBS 2043 (100%)	<i>T. dermatis</i> CBS 2043 (99,8%) <i>T. mucoides</i> CBS 7653 (99,8%)
DLC 11	<i>T. asahii</i> (97%)	<i>T. inkin</i> CBS 5585 (80%) <i>T. inkin</i> CNM-CL6516 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 8640 (98,2%) <i>T. inkin</i> (100%) <i>T. ovoides</i> (99,5%)
DLC 12	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
DLC 14	<i>T. asahii</i> (91%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
DLC 15	<i>T. asahii</i> (95%)	<i>T. inkin</i> CBS 5585 (80,8%) <i>T. inkin</i> CNM-CL6516 (99,5%)	<i>T. asahii</i> CBS 8640 (98,2%) <i>T. inkin</i> (100%) <i>T. ovoides</i> (99,5%)
DLC 16	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. inkin</i> CBS 5585 (80,8%) <i>T. inkin</i> CNM-CL6516 (99,5%)	<i>T. asahii</i> CBS 8640 (98,2%) <i>T. inkin</i> (100%) <i>T. ovoides</i> (99,5%)
IAL 02	<i>T. asahii</i> (97%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
IAL 03	<i>T. asahii</i> (94%)	<i>T. faecale</i> CBS 4828 (94,7%) <i>T. faecale</i> CNM-CL4327 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (99,5%) <i>T. insectorium</i> CBS 10421 (100%) <i>T. faecale</i> CBS 4828 (99,8%)
IAL 04	<i>T. inkin</i> (95%)/ <i>T. asahii</i> (94%)	<i>T. faecale</i> CBS 4828 (97,2%) <i>T. faecale</i> CNM-CL6515 (97,5%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (99,5%) <i>T. insectorium</i> ATCC 20506 (100%) <i>T. faecale</i> CBS 10565 (98,5%) <i>T. coremiiforme</i> CBS 2482 (98,8%)
IAL 05	<i>T. asahii</i> (95%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
IAL 06	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (98,8%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
IAL 07	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
IAL 11	<i>T. asahii</i> (97%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
IAL 12	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (98,7%)

Nota: isolados destacados em **negrito** apresentaram discordância de identificação

*(%) Valores de probabilidade em relação ao banco de dados do VITEK 2

** (%) Identidade com sequências disponibilizadas em CBS e *GenBank*

Tabela 3. Identificação de espécies dos **55** isolados de *Trichosporon* spp. não invasivos. Resultados das análises pelo sistema VITEK 2 e por sequenciamentos da região IGS1

Sigla	Espécies identificadas pelo sistema VITEK 2*	Espécies identificadas por sequenciamento da região IGS1**
DLC 09	<i>T. asahii</i> (94%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
IAL 01	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 10004 (99 %) <i>T. asahii</i> CBS 2479 (99 %)
IAL 10	<i>T. asahii</i> (93%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
IAL 13	<i>T. asahii</i> (91%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
IAL 14	<i>T. asahii</i> (96%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
IAL 15	<i>T. asahii</i> (94%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
1A	<i>T. asahii</i> (94%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
2A	<i>T. asahii</i> (93%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
3A	<i>T. asahii</i> (91%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
4A	<i>T. asahii</i> (96%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
6A	<i>T. asahii</i> (93%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
7A	<i>T. asahii</i> (90%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
8A	<i>T. asahii</i> (91%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
9A	<i>T. asahii</i> (93%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
2B	<i>T. asahii</i> (93%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
3B	LD	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
4B	<i>T. asahii</i> (95%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
8B	<i>T. asahii</i> (90%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
9B	<i>T. asahii</i> (95%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
1C	<i>T. asahii</i> (98%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
2C	<i>T. asahii</i> (94%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
3C	<i>T. asahii</i> (98%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
8C	<i>T. asahii</i> (94%)	<i>T. inkin</i> CBS 5585 (89,8%) <i>T. inkin</i> CNM-CL6099 (100%)
9C	<i>T. asahii</i> (95%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
1D	<i>T. asahii</i> (93%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
3D	<i>T. asahii</i> (98%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
5D	<i>T. asahii</i> (98%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
8D	<i>T. asahii</i> (98%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
9D	<i>T. asahii</i> (91%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
1E	<i>T. asahii</i> (98%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
5E	<i>T. asahii</i> (92%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
6E	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
9E	<i>T. asahii</i> (97%)	<i>T. inkin</i> CBS 5585 (89,8%) <i>T. inkin</i> CNM-CL6516 (100%)
2F	<i>T. asahii</i> (92%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
3F	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
4F	<i>T. asahii</i> (98%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
5F	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
6F	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)

Sigla	Espécies identificadas pelo sistema VITEK 2*	Espécies identificadas por sequenciamento da região IGS1**
9F	<i>T. asahii</i> (91%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
1G	<i>T. asahii</i> (94%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
2G	<i>T. asahii</i> (91%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
3G	<i>T. asahii</i> (97%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
8G	<i>T. asahii</i> (97%)	<i>T. faecale</i> CBS 4828 (100%)
1H	<i>T. asahii</i> (93%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
2H	<i>T. asahii</i> (94%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
3H	<i>T. asahii</i> (96%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
4H	<i>T. asahii</i> (93%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
5H	<i>T. asahii</i> (91%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
6H	<i>T. asahii</i> (95%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
8H	<i>T. asahii</i> (97%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
9H	<i>T. asahii</i> (93%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
1I	<i>T. asahii</i> (91%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
2I	<i>T. asahii</i> (96%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
5I	<i>T. asahii</i> (96%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)
6I	<i>T. asahii</i> (99%)	<i>T. asahii</i> CBS 2479 (100%)

Nota: isolados destacados em **negrito** apresentaram discordância de identificação

*(%) Valores de probabilidade em relação ao banco de dados do VITEK 2

** (%) Identidade com sequências disponibilizadas em CBS e *GenBank*

LD = baixa discriminação

5.4.3 Testes de sensibilidade à temperatura e tolerância a cicloheximida

Os resultados obtidos nestes testes foram comparados com os parâmetros fisiológicos descritos na literatura (De Hoog *et al.*, 2002; Kurtzman e Fell, 2011), utilizados para a identificação das sete espécies de *Trichosporon* mais relevantes na prática clínica (*T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. loubieri*, *T. mucoides* e *T. ovoides*).

Nas avaliações de termotolerância, todos os isolados e cepas de referência de *Trichosporon* spp. apresentaram crescimento à temperatura de 37°C, mas apenas o isolado 9E e a cepa de referência *T. inkin* cresceram à temperatura de 40°C; nenhum isolado se desenvolveu à 42°C. Quanto à cicloheximida, todos os isolados e cepas de referência apresentaram crescimento à concentração de 0,01%, exceto o isolado IAL 05. Na concentração de 0,1%, as cepas de referência *T. asahii* e *T. inkin*, bem como os isolados IAL05, IAL12, IAL13 e IAL14 não se desenvolveram. Pela análise desses parâmetros, foi possível apenas inferir que dentre todos os isolados avaliados, nenhum pertencia à espécie *T. cutaneum*, uma vez que esta espécie não se desenvolve à 37°C.

5.5 Identificação dos isolados de *Trichosporon* spp. por técnicas moleculares

5.5.1 Extração de DNA e detecção do material amplificado por PCR

Em relação ao processo de extração de DNA, verificou-se durante o estudo, que maior quantidade de material genômico era obtida, quando foram utilizadas suspensões da levedura cultivadas em caldo YPD, sob agitação, por 24 horas à 30°C.

Os produtos das amplificações realizadas nas regiões IGS1 e D1/D2 foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 1,5%. Para todos os isolados, as amplificações resultaram em bandas únicas, com tamanhos moleculares correspondentes a aproximadamente 600 pares de base para ambas as regiões (**Figuras 5 e 6**).

Figura 5. Géis de agarose a 1,5% mostrando bandas amplificadas por PCR com os *primers* 26F e 5SR (**região IGS1**) para alguns isolados do estudo. L= marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); R⁻ e E⁻ = controles negativos; C⁺ = controle positivo (DNA de *T. asahii* ATCC 90039); pb = pares de base

Figura 6. Géis de agarose a 1,5% mostrando bandas amplificadas pela PCR com os *primers* NL1 e NL4 (**região D1/D2**) para alguns isolados do estudo. L= marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); R⁻ e E⁻ = controles negativos; C⁺ = controle positivo (DNA de *T. asahii* ATCC 90039); pb = pares de base

5.5.2 Análise dos sequenciamentos

Dos 19 isolados invasivos, 10 (52,6%) foram identificados como *T. asahii* pelas duas regiões sequenciadas (IGS1 e D1/D2), e apresentaram concordância de 100% com os resultados obtidos pelo sistema VITEK 2. As sequências obtidas da região IGS1 dos nove isolados restantes, apresentaram identidades em torno de 80% com as poucas sequências disponíveis na coleção da CBS; entretanto, quando comparadas a sequências confiáveis depositadas no *GenBank*, como as da *Spanish National Center of Microbiology* (CNM), as identidades foram de 100% ou muito próximas deste valor, exceto para o isolado IAL 04, cuja identidade ficou próxima de 97%, mesmo após a repetição dos sequenciamentos desta região por mais duas vezes; para este isolado, a identificação molecular foi considerada inconclusiva (**Tabela 2**). Portanto, pela técnica molecular, oito isolados foram identificados como *T. inkin* (6), *T. faecale* (1) e *T. dermatis* (1). Com exceção deste último, identificado como *T. mucoides*, os sete restantes foram identificados como *T. asahii* pelo sistema VITEK 2 (**Tabela 2**). Deste modo, para os 18 isolados invasivos com identificação molecular da região IGS1 conclusiva, a discordância entre as duas metodologias foi de 44,4%.

Em relação às identificações dos nove isolados através do sequenciamento da região D1/D2, os resultados não permitiram definir as espécies, uma vez que as porcentagens de identidade foram muito próximas para *T. asahii* e *T. inkin* e, em alguns casos, para outras espécies de *Trichosporon* disponíveis nos bancos genômicos (**Tabela 2**). Do mesmo modo, para o isolado IAL 04 a identificação pela região D1/D2 não resultou na definição da espécie. Portanto, a identificação de espécie para este isolado invasivo não foi determinada tanto pelo método fenotípico como molecular.

Dos 55 isolados não invasivos, 52 foram identificados como *T. asahii* pelos sequenciamentos da região IGS1, sendo os resultados concordantes em 94,6% dos casos com a identificação fenotípica. Dois isolados foram identificados como *T. inkin* e um isolado como *T. faecale*, com 100% de identidade com sequências da CBS e/ou *GenBank*, enquanto o sistema VITEK 2 identificou os três isolados como *T. asahii* (**Tabela 3**). O isolado 3B, cuja identificação não foi possível pelo sistema VITEK 2, com baixa discriminação, foi identificado como *T. asahii* pelo sequenciamento da região IGS1 (**Tabela 3**).

Por fim, vale ressaltar que as três cepas de *Trichosporon* spp. ATCC também foram submetidas às reações de sequenciamento da região IGS1. Para as cepas *T. asahii*

e *T. inkin*, a identificação molecular confirmou as espécies; entretanto, a cepa *T. mucoides* foi identificada como *T. dermatis* com 100% de identidade com outras cepas de referência da CBS e *GenBank*, resultado confirmado após repetições da análise molecular.

5.6 Testes de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos

5.6.1 Microdiluição em caldo - EUCAST

Os resultados dos testes obtidos com leituras após incubação das placas por 48 horas, apresentaram valores de densidade ótica mais adequados para se determinar crescimento fúngico (faixa linear de crescimento), quando comparados à incubação por 24 horas. Para três isolados (DLC09, DLC12 e 3B) foi necessária a repetição dos testes, com incubação das placas sob agitação (350 rpm) à temperatura de 30°C por 48 horas.

Os valores de CIM observados pelo método EUCAST, para os isolados de infecção invasiva e não invasivos, estão descritos no **Anexo C**. Com base nos valores de *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST para leveduras do gênero *Candida* para FCZ, VCZ e AMB (**Tabela 1**), os isolados de *Trichosporon* spp. deste estudo foram classificados em sensíveis, intermediários e resistentes (**Tabelas 4 e 5**).

Tabela 4. Classificação dos **19** isolados de infecção invasiva em resistentes, intermediários e sensíveis, pelo método de referência EUCAST

FÁRMACO	Classificação (número e %) de isolados		
	Resistentes	Intermediários	Sensíveis
FCZ	7 (36%)	6 (32%)	6 (32%)
VCZ	2 (11%)	0	17 (89%)
AMB	15 (79%)	0	4 (21%)

FCZ = fluconazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B

Tabela 5. Classificação dos **55** isolados não invasivos em resistentes, intermediários e sensíveis pelo método de referência EUCAST

FÁRMACO	Classificação (número e %) de isolados		
	Resistentes	Intermediários	Sensíveis
FCZ	23 (42%)	17 (31%)	15 (27%)
VCZ	3 (5%)	0	52 (95%)
AMB	34 (62%)	0	21 (38%)

FCZ = fluconazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B

Esses resultados permitiram observar que, em relação aos azólicos com critérios interpretativos, VCZ mostrou melhor atividade antifúngica, a maioria dos isolados de ambos os grupos foram classificados como sensíveis ao fármaco. Para AMB, 79% das leveduras de infecção invasiva e 62% dos isolados não invasivos foram resistentes.

5.6.2 Microdiluição em caldo - *Sensititre YeastOne*

Os valores de CIM observados por este método para os dois grupos de isolados estão descritos no **Anexo D**. Não houve diferença de resultados entre as leituras de 24 e 48 horas.

Na determinação dos valores de CIM para CAS, foi possível observar que os 74 isolados de *Trichosporon* spp. apresentaram crescimento mesmo sob a maior concentração do fármaco (16 mg/L). Em relação ao POS, observaram-se valores de CIM > 0,06 para a quase totalidade dos isolados invasivos (89%) e não invasivos (98%), sendo considerados resistentes. VCZ foi o fármaco de melhor eficácia *in vitro* para os isolados de infecção invasiva; entretanto, 55% dos não invasivos apresentaram resistência (**Tabela 7**). Em relação à AMB, 100% dos isolados invasivos foram sensíveis ao antifúngico, enquanto 62% dos não invasivos apresentaram valores de resistência. Para FCZ, verificou-se que quase 50% dos isolados invasivos e 91% dos não invasivos mostraram resistência ao fármaco (**Tabelas 6 e 7**).

Tabela 6. Classificação dos **19** isolados de infecção invasiva em resistentes, intermediários e sensíveis pelo método *Sensititre YeastOne*

FÁRMACO	Classificação (número e %) de isolados		
	Resistentes	Intermediários	Sensíveis
FCZ	9 (47%)	3 (16%)	7 (37%)
VCZ	4 (21%)	-	15 (79%)
AMB	0	-	19 (100%)
POS	17 (89%)	-	2 (11%)

FCZ = fluconazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B; POS = posaconazol; (-) = sem categoria intermediária definida

Tabela 7. Classificação dos **55** isolados não invasivos em resistentes, intermediários e sensíveis pelo método *Sensititre YeastOne*

FÁRMACO	Classificação (número e %) de isolados		
	Resistentes	Intermediários	Sensíveis
FCZ	50 (91%)	2 (4%)	3 (5%)
VCZ	30 (55%)	-	25 (45%)
AMB	34 (62%)	-	21 (38%)
POS	54 (98%)	-	1 (2%)

FCZ = fluconazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B; POS = posaconazol; (-) = sem categoria intermediária definida

5.6.3 Análises comparativas dos testes de suscetibilidade

5.6.3.1 Comparação dos resultados entre isolados invasivos e não invasivos pelo método EUCAST

Esta análise foi realizada somente com os valores de CIM obtidos pelo método EUCAST (**Anexo C**). Os dados demonstraram que, com exceção de 5FC ($p=0,01$) e ITZ ($p=0,02$), para os demais fármacos não houve diferenças estatisticamente significantes ($p \geq 0,05$) entre os dois grupos de isolados. Os valores de CIM de ITZ e 5FC foram mais elevados para os isolados invasivos, como é possível observar na **Figura 7**.

Figura 7. Valores de CIM obtidos pelo método EUCAST para isolados de infecção invasiva e não invasivos, , após análise pelo teste de *Mann-Whitney*. (1) = isolados de infecção invasiva; (2) = isolados não invasivos; **A:** AMB = anfotericina B; **B:** CTZ = cetoconazol; **C:** 5FC = 5-fluocitosina; **D:** FCZ = fluconazol; **E:** ITZ = itraconazol; **F:** VCZ = voriconazol

Em relação aos parâmetros de resistência cruzada e/ou múltipla, foi possível verificar pelo método EUCAST, que dos 19 isolados invasivos, dois (10%) mostraram tanto resistência cruzada entre os azóis FCZ e VCZ, como múltipla (resistência à AMB), e outros quatro isolados (21%) apresentaram somente resistência múltipla entre

FCZ e AMB. Dos 55 isolados não invasivos, três (5%) foram resistentes aos fármacos FCZ e VCZ (resistência cruzada) e também multirresistentes, enquanto outros 16 (29%) foram apenas multirresistentes. (Figura 8).

Figura 8. Distribuição de isolados (invasivos e não invasivos) quanto ao tipo de resistência aos fármacos FCZ, VCZ e AMB: sensível e/ou intermediário (S+I); resistente a apenas um dos fármacos (R=1); resistência cruzada e múltipla (C+M) e resistência múltipla (M), com valores de CIM obtidos pelo método EUCAST

5.6.3.2 Comparação de suscetibilidade entre espécies de *Trichosporon* pelo método EUCAST

Na avaliação dos valores de CIM em relação às quatro espécies identificadas entre os 74 isolados (*T. asahii*, *T. inkin*, *T. faecale* e *T. dermatis*), foi possível observar que o único isolado de *T. dermatis* do estudo, apresentou valores menores de CIM para os fármacos ITZ, AMB e FCZ, quando comparado às outras espécies. Os isolados de *T. asahii* foram menos sensíveis ao voriconazol. *Trichosporon asahii* e *T. faecale* apresentaram valores de CIM para fluconazol na faixa de resistência, bem como valores mais elevados de CIM para 5FC em relação à *T. inkin*. Para as três espécies, os valores de CIM foram semelhantes para os fármacos ITZ, CTZ e VCZ (Anexo E). As quatro espécies apresentaram valores de CIM 50% e 90% na faixa de resistência para AMB (Tabela 8).

Tabela 8. Suscetibilidade (CIM em mg/L) das espécies de *Trichosporon* aos seis antifúngicos, determinada pelo método EUCAST

Espécie (n)	Fármaco Parâmetro	FCZ	ITZ	CTZ	VCZ	AMB	5-FC
<i>T. asahii</i> (62)	Intervalo CIM	0,25 - 64	0,015 - 1	0,015 - 2	0,015 - 1	0,25 - 8	0,12 - 32
	MG	5,35	0,11	0,44	0,08	2,19	3,05
	CIM 50%	4	0,12	0,5	0,06	2	2
	CIM 90%	16	0,25	1	0,12	8	16
<i>T. inkin</i> (8)	Intervalo CIM	1 - 64	0,03 - 0,5	0,06 - 1	0,015 - 0,06	0,5 - 4	0,12 - 4
	MG	2,83	0,13	0,17	0,04	1,54	1,82
	CIM 50%	2	0,12	0,06	0,03	1	2
	CIM 90%	4	0,25	0,5	0,06	4	4
<i>T. faecale</i> (2)	Intervalo CIM	2 - 64	0,12 - 0,12	0,25 - 0,5	0,03 - 0,06	2 - 4	1 - 16
	MG	6,35	0,12	0,31	0,04	3,00	5,04
	CIM 50%	2	-	0,25	0,03	2	8
	CIM 90%	64	0,12	0,5	0,06	4	16
<i>T. dermatitis</i> (1)	CIM *	0,12	0,03	0,06	0,06	0,5	4
	MG	-	-	-	-	-	-
	CIM 50%	-	-	-	-	-	-
	CIM 90%	-	-	-	-	-	-

Obs.: Isolado IAL 04 não foi incluído na tabela.

** sem intervalo de CIM, por ser apenas um isolado.

n = número de isolados avaliados; MG = média geométrica; FCZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; CTZ = cetoconazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B; 5-FC = 5-fluocitosina; (-) Não foi possível calcular o parâmetro; valores em mg/L

5.6.3.3 Comparação entre os métodos de referência e o comercial

A partir dos valores de CIM obtidos pelos dois testes de suscetibilidade, foram calculadas as modas, faixas de sensibilidade (intervalos), médias geométricas, e CIMs 50% e 90% para cada fármaco avaliado (**Tabelas 9 e 10**).

Tabela 9. Resultados das médias geométricas, modas, faixas de sensibilidade, e CIM 50% e 90%, para os **74** isolados de *Trichosporon* spp., obtidos pelo método **EUCAST**

FÁRMACO	CIMs para isolados invasivos (n=19)					CIMs para isolados não invasivos (n=55)				
	MODA	Intervalo	MG	CIM 50%	CIM 90%	MODA	Intervalo	MG	CIM 50%	CIM 90%
FCZ	4	0,12 – 64	5,15	4	64	4	0,25 – 64	4,61	4	16
ITZ	0,25	0,03 – 0,5	0,16	0,12	0,5	0,12	0,015 – 1	0,10	0,12	0,25
CTZ	0,5	0,06 – 1	0,36	0,5	1	0,5	0,015 – 2	0,38	0,5	1
VCZ	0,06	0,03 – 1	0,08	0,06	0,5	0,06	0,015 – 1	0,07	0,06	0,12
AMB	8	0,5 – 8	2,88	4	8	2	0,25 – 8	1,85	2	8
5-FC	4	1 – 32	5,15	4	16	2	0,12 – 16	2,39	2	16

MG = média geométrica; FCZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; CTZ = cetoconazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B; 5-FC = 5-fluocitosina; valores em mg/L

Tabela 10. Resultados das médias geométricas, modas, faixas de sensibilidade, e CIM 50% e 90%, para os **74** isolados de *Trichosporon* spp., obtidos pelo método **Sensititre YeastOne**

FÁRMACO	CIMs para isolados invasivos (n=19)					CIMs para isolados não invasivos (n=55)				
	MODA	Intervalo	MG	CIM 50%	CIM 90%	MODA	Intervalo	MG	CIM 50%	CIM 90%
FCZ	2	1 – 128	5,76	4	128	16	2 – 256	17,28	16	32
ITZ	0,25	0,06 – 1	0,26	0,25	0,5	0,5	0,06 – 1	0,5	0,5	1
CTZ	0,5	0,06 – 4	0,34	0,5	2	1	0,06 – 2	1,02	1	2
VCZ	0,06	0,03 – 2	0,11	0,25	2	0,12	0,12 – 1	0,22	0,25	0,5
AMB	0,5	0,03 – 0,25	0,18	0,25	1	2	0,03 – 2	0,98	-	2
5-FC	4	2 – 64	7,17	4	32	4	0,5 – 64	4	4	8
POS	0,5	0,06 – 1	0,33	0,5	1	1	0,06 – 2	0,81	-	1
CAS	16	8 – 16	15,43	-	16	16	16 – 16	16	-	16

CIM, concentração inibitória mínima MG = média geométrica; FCZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; CTZ = cetoconazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B; 5-FC = 5-fluocitosina; CAS = caspofungina; POS = posaconazol (-) = sem valor de CIM 50%; valores em mg/L

A análise da **Tabela 9** permite verificar que, para o teste EUCAST, os parâmetros calculados a partir dos valores de CIM foram semelhantes entre isolados invasivos e não invasivos, sendo que CIM 50% e 90% foram mais elevados para FCZ, AMB e 5FC, e menores para VCZ. Pelo teste comercial, os valores de CIM também

foram equivalentes entre os dois grupos de isolados de *Trichosporon* spp.. Saliente-se que os valores de CIM obtidos com AMB, para todos os isolados de infecção invasiva, encontravam-se dentro da faixa de sensibilidade (**Tabela 10**).

Na comparação estatística, entre os valores de CIM obtidos por EUCAST e *Sensititre YeastOne*, os resultados demonstraram diferenças significantes, com valores mais elevados de CIM para os fármacos FCZ, ITZ, CTZ, VCZ e 5FC, e menores para AMB pelo método comercial (**Figura 9**).

Figura 9. Diferenças entre CIMs obtidas pelos métodos EUCAST e *Sensititre*, após análise pelo teste de *Mann-Whitney*. (E) = EUCAST; (Y) = *Sensititre YeastOne* A: AMB = anfotericina B; B: CTZ = cetoconazol; C: 5FC = 5-fluocitosina; D: FCZ = fluconazol; E: ITZ = itraconazol; F: VCZ = voriconazol

Em relação à análise de concordância essencial, a variação foi de 64 a 81% (**Tabela 11**), sendo que na maior parte das vezes, as diferenças acima de ± 2 diluições, apontavam valores de CIM mais elevados para o teste comercial.

Tabela 11. Percentuais de concordância essencial e discrepância observados para o teste *Sensititre YeastOne* em relação ao método EUCAST, para os **74** isolados de *Trichosporon* spp.

Fármaco	Concordância Essencial (%)	Discrepância (%)
FCZ	72	28
ITZ	64	36
CTZ	81	19
VCZ	80	20
AMB	70	30
5-FC	72	28

FCZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; CTZ = cetoconazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B; 5-FC = 5-fluocitosina

A análise de concordância categórica revelou que o teste comercial apresentou erros da categoria grave com maior frequência para o FCZ, enquanto para AMB a porcentagem de erros muito graves atingiu 53% dos casos (**Tabela 12**).

Tabela 12. Erros categóricos (%) observados na comparação do teste *Sensititre YeastOne* com o método de referência (EUCAST), para os **74** isolados de *Trichosporon* spp.

Fármaco	ERRO CATEGÓRICO (%)		
	Menor	Grave	Muito grave
FCZ	35	62	6,6
VCZ	0	42	0
AMB	0	44	53

FCZ = fluconazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B

5.7 Detecção da GXM na parede celular dos isolados de *Trichosporon* spp.

A detecção de GXM dos 74 isolados de *Trichosporon* spp., pela citometria de fluxo com anticorpo monoclonal anti-GXM gerou resultados que foram analisados de duas maneiras: porcentagem de fluorescência e intensidade de fluorescência (média). Ambas as análises foram comparadas aos controles negativos, ou seja, a células não “marcadas” pelo anticorpo monoclonal.

Através da **Figura 10** observa-se que a “marcação” dos isolados com o anticorpo anti-GXM variou de aproximadamente 60 a 100% das células (com exceção de um isolado não invasivo e da cepa de referência *T. asahii*), com uma mediana de 80% das células marcadas. Este resultado demonstrou que a “marcação” dos isolados com o anti-GXM foi bem sucedida, permitindo a etapa de análise da intensidade de fluorescência. A **Figura 11** mostra que os valores variaram entre os isolados, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, invasivos e não invasivos ($p=0,08$). Os valores de intensidade de fluorescência se encontram detalhados em **Anexo F**.

Figura 10. Valores de **porcentagem de fluorescência** obtidos na marcação dos isolados de *Trichosporon* spp., cepas ATCC e *C. neoformans* H99, com o anticorpo monoclonal anti-GXM e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, por citometria de fluxo; (-) α -GXM = células não marcadas

Figura 11. Valores de **intensidade de fluorescência** obtidos para os isolados de *Trichosporon* spp., cepas ATCC e *C. neoformans* H99, por citometria de fluxo com anticorpo monoclonal anti-G e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo; (-) α -GXM = células não marcadas

6. DISCUSSÃO

As leveduras do gênero *Trichosporon* são importantes patógenos emergentes, cujos estudos têm sido conduzidos com maior frequência na América do Norte, Europa e Ásia (Girmenia *et al.*, 2005). No Brasil, há poucos relatos sobre a distribuição e prevalência das espécies desse gênero em episódios de infecção hospitalar, particularmente em um hospital terciário de grande porte como o HC-FMUSP. Assim, foram avaliados, no presente estudo, os aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares, bem como dados de suscetibilidade a fármacos antifúngicos, em isolados de *Trichosporon* spp. obtidos de amostras clínicas de pacientes internados em diversas unidades do complexo HC, e de alguns pacientes de outras unidades hospitalares da rede estadual de saúde do Estado de São Paulo. Foi ainda incluída neste estudo, uma avaliação preliminar da presença de GXM na parede celular dessas leveduras, com o intuito de se verificar se havia diferenças na expressão deste polissacarídeo entre isolados de infecção invasiva e não invasivos.

Os métodos fenotípicos para identificação de gênero e espécies de *Trichosporon* são baseados em características micro-morfológicas e no perfil bioquímico, sendo amplamente utilizados em laboratórios de rotina diagnóstica. A observação microscópica das leveduras, constatando a presença de artroconídios e blastoconídios, bem como a hidrólise de ureia, são resultados suficientes para a determinação do gênero *Trichosporon*, e definem as etapas seguintes a serem adotadas para identificação das espécies (Sugita *et al.*, 2002; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008; Silvestre Junior, 2009; Colombo, Padovan e Chaves, 2011).

Diversos autores relatam as limitações dos métodos fenotípicos para definir espécies, por apresentarem resultados subjetivos e com muitas variáveis (Sugita *et al.*, 2002; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005). Um estudo envolvendo três diferentes laboratórios de referência em diagnóstico micológico, com o objetivo de se determinar as características fisiológicas e bioquímicas de seis isolados de *Trichosporon* spp. de importância clínica, apresentaram discrepâncias significativas em seus resultados (Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008).

No presente estudo, a mesma dificuldade foi encontrada, não tendo sido possível observar as estruturas micromorfológicas que poderiam auxiliar na

diferenciação de algumas espécies do gênero, como por exemplo os apressórios. Do mesmo modo, as variações observadas nos parâmetros fisiológicos (sensibilidade às diversas temperaturas e tolerância à cicloheximida) não permitiram definir espécies, mesmo quando analisadas conjuntamente com outras características fenotípicas (morfologia e perfil bioquímico).

Apesar da limitação dos métodos fenotípicos, os diversos sistemas comerciais disponíveis se baseiam em tais características para identificar a levedura. O sistema VITEK 2 utiliza a assimilação de açúcares e de outras substâncias, e por comparação com parâmetros definidos em seu banco de dados, define a espécie através de probabilidade. Entretanto, o sistema se limita a identificar, até o momento, apenas as espécies *T. asahii*, *T. inkin* e *T. mucoides* (Colombo, Padovan e Chaves, 2011).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o sistema VITEK 2 discordou da identificação molecular em 44,4% dos isolados de infecção invasiva, e em 5,5% dos não invasivos, identificando a maior parte deles como *T. asahii*. Para dois isolados (IAL 04 e 3B), o sistema não liberou resultados conclusivos, sendo necessária a realização de provas de assimilação pela metodologia clássica para completar a identificação fenotípica. Entretanto, através do auxanograma, também não foi possível definir as espécies desses isolados, resultado que corrobora os achados de outros autores que relatam a grande dificuldade em definir espécies de *Trichosporon* através de metodologia fenotípica (Sugita *et al.*, 2002; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Chagas-Neto, 2007).

Os erros de identificação do sistema VITEK 2 para leveduras do gênero *Trichosporon*, não estão relacionados somente à limitação de seu banco de dados (resultados garantidos somente para *T. asahii*, *T. inkin* e *T. mucoides*), mas também a possíveis falhas na interpretação do perfil bioquímico pelo próprio sistema automatizado. Explica-se esta última afirmação, pelo fato de que, entre os açúcares utilizados pelo sistema VITEK 2, estão a ramnose e a L-arabinose, que são assimilados por *T. asahii*, mas não por *T. inkin* (Kurtzman e Fell, 2011). Entretanto, os isolados identificados como *T. asahii* pelo VITEK 2, e posteriormente identificados pela técnica molecular como *T. inkin*, apresentaram assimilação negativa para esses dois carboidratos. Ahmad *et al.* (2005) também observaram a tendência do sistema VITEK em identificar com maior frequência *T. asahii*, ao compararem a identificação de cepas

de referência desta espécie com cepas de *T. asteroides*; o sistema identificou todas as cepas como *T. asahii*.

O sistema identificou ainda dois isolados de *T. faecale* (1 invasivo e 1 não invasivo) como *T. asahii*, com elevado percentual de probabilidade ($\geq 94\%$). Dados da literatura demonstram que para a maior parte dos açúcares, as assimilações de diversas espécies de *Trichosporon* são idênticas entre si, ou são variáveis dentro de uma mesma espécie, dificultando a interpretação dos resultados, mesmo para os sistemas automatizados comerciais (Kurtzman e Fell, 2011).

Um isolado invasivo (DLC 10) foi identificado como *T. mucoides* pelo sistema VITEK 2, mas o sequenciamento da região IGS1 resultou na identificação da espécie *T. dermatitis* com 100% de identidade. Esta discordância também foi observada por outros autores, ao compararem os métodos de identificação fenotípica com as técnicas moleculares para estas duas espécies (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Gunn *et al.*, 2006; Chagas-Neto, 2007). Entretanto, o sequenciamento da região D1/D2 resultou em identidades idênticas para ambas as espécies (**Tabela 2**), demonstrando que nesta região do DNA ribossomal as duas espécies possuem sequências com pouca variação, não sendo possível diferenciá-las. Sugita *et al.* (2004) demonstraram, por análise filogenética, que essas espécies são geneticamente muito relacionadas, classificando-as no mesmo clado *cutaneum*.

Em relação aos sequenciamentos, foi possível observar neste estudo, que a região IGS1 é mais adequada para a identificação molecular das espécies de *Trichosporon*, permitindo melhor discriminação quando comparada à região D1/D2. Entretanto, é uma região que apresenta maior polimorfismo, com variações entre espécies idênticas; deste modo, é possível que as comparações com sequências de referência disponíveis nos bancos genômicos não resultem sempre em valores de identidade de 100% (Guo *et al.*, 2011).

Por outro lado, de acordo com outros autores, valores de identidade menores que 99,5% podem resultar em identificações inconclusivas, pois há pequenas diferenças nas sequências de bases entre espécies diferentes, mas geneticamente relacionadas. Há ainda a possibilidade de erros de identificação devido aos bancos genômicos que disponibilizam sequências com má qualidade (Pfaller *et al.*, 2012).

Deste modo, nos casos em que as análises das regiões IGS1 e D1/D2 não permitam identificação conclusiva da espécie, sequenciamentos de outros genes da

levedura tornam-se necessários, através da técnica de MLST (*Multilocus sequence typing*) (Guo *et al.*, 2011; Spampinato e Leonardi, 2013).

Além da técnica de MLST, metodologias baseadas em proteômica, como MALDI-TOF, também têm sido aplicadas na identificação de espécies de fungos. Esta última pode ser utilizada como alternativa aos métodos moleculares, pois os resultados são confiáveis, com a vantagem de serem obtidos mais rapidamente do que os sequenciamentos (Stevenson *et al.*, 2010; Colombo, Padovan e Chaves, 2011). Vale ressaltar, que através do MALDI-TOF foi possível a identificação do isolado IAL 04, que pertence à espécie *T. faecale* (João Nóbrega de Almeida Jr., comunicação pessoal).

Embora os testes de suscetibilidade *in vitro* sejam considerados como um importante auxílio no tratamento de pacientes portadores de infecções fúngicas sistêmicas, esses métodos, até o momento, estão padronizados apenas para dois gêneros de leveduras e alguns fungos filamentosos (CLSI, 2008b; Arendrup *et al.*, 2012). Na literatura, há poucos relatos de emprego desses testes para leveduras não fermentativas (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2000; Rodríguez-Tudela *et al.*, 2005; Zaragoza *et al.*, 2011); entretanto, até o momento essas propostas não foram adotadas pelo CLSI ou EUCAST.

No presente estudo, o método de referência empregado (EUCAST) se mostrou adequado para avaliação da suscetibilidade *in vitro* dos isolados de *Trichosporon* spp.. Apenas três isolados (3/74, 4%) apresentaram crescimento lento nas condições de incubação padronizadas para o método, tendo sido necessárias algumas modificações, como a utilização de agitação (350 rpm) e incubação a 30°C. Estas alterações foram adotadas em nosso estudo, baseadas nos relatos de Rodríguez-Tudela *et al.* (2005) e Zaragoza *et al.* (2011), que propuseram modificações nos testes de suscetibilidade para leveduras não fermentativas (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum* e *Trichosporon*). Embora esses autores também sugeriram a utilização do meio de cultura YPD para incubação de leveduras não fermentativas, o meio RPMI (padrão para testes de microdiluição em caldo) não afetou o desempenho dos testes.

Estudos demonstram que a anfotericina B apresenta pouca eficácia na terapêutica das tricosporonoses, apesar dos testes de suscetibilidade *in vitro* apresentarem resultados muito variáveis entre os autores (Colombo, Padovan e Chaves, 2011). Relatos demonstram que as equinocandinas são ineficientes *in vitro* contra *Trichosporon* spp. (Anaissie *et al.*, 1992; Ruan, Chien e Hsueh, 2009). Neste estudo, verificou-se que todos os isolados de *Trichosporon* spp. foram capazes de se

desenvolver na presença da concentração mais elevada de caspofungina, demonstrando resistência ao fármaco, e que 66% dos isolados foram resistentes à anfotericina B, resultados que estão de acordo com os dados divulgados por outros autores (Girmenia *et al.*, 2005; O'gorman *et al.*, 2006; Bayramoglu *et al.*, 2008; Ruan, Chien e Hsueh, 2009).

Em relação à 5FC, verificou-se que a CIM 90% foi elevada (16 mg/L) para os dois grupos de isolados, demonstrando que este fármaco parece não ser adequado para a terapêutica de infecções por *Trichosporon* spp.; a mesma observação foi relatada por Quindós *et al.* (2004).

Dos 74 isolados de *Trichosporon* spp. avaliados, 93% foram sensíveis ao voriconazol, resultados semelhantes aos relatados por outros autores (Paphitou *et al.*, 2002; Asada *et al.*, 2006; Araujo Ribeiro *et al.*, 2008); entretanto os resultados deste estudo foram discordantes em relação ao posaconazol, pois 96% dos isolados foram resistentes ao fármaco, enquanto outros autores demonstraram sua eficácia sobre o *Trichosporon* spp. (Araujo Ribeiro *et al.*, 2008; Colombo, Padovan e Chaves, 2011; Miceli, Díaz e Lee, 2011). É importante ressaltar que neste estudo a avaliação do posaconazol foi realizada somente pelo método comercial, que de modo geral, mostrou valores de CIM mais elevados para a maior parte dos fármacos quando comparado ao método EUCAST.

Foi possível observar que aproximadamente 7% do total de isolados do estudo, apresentaram resistência cruzada e múltipla entre FCZ, VCZ e AMB; e 27% apresentaram resistência múltipla entre FCZ e AMB. Vale ressaltar que esses três fármacos são os mais empregados no tratamento de pacientes com infecções fúngicas oportunistas (Fournier *et al.*, 2002; Asada *et al.*, 2006; Matsue *et al.*, 2006; Ruan, Chien e Hsueh, 2009; Liao *et al.*, 2012). Este fato poderia estar relacionado aos casos de falhas no tratamento das tricosporonoses com o emprego desses fármacos (O'gorman *et al.*, 2006; Bayramoglu *et al.*, 2008; Hashino *et al.*, 2013).

Embora seja descrito que *T. asahii* apresenta maior sensibilidade aos azóis quando comparado às demais espécies (Wolf *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2002; Araujo Ribeiro *et al.*, 2008), neste estudo observou-se que *T. asahii*, *T. faecale* e *T. inkin* apresentaram perfil de suscetibilidade semelhante frente a esses fármacos (**Anexo D**).

Além disso, no estudo de Miceli *et al.* (2011), *T. inkin* apresentou maior suscetibilidade do que *T. asahii* em relação à FCZ; nossos resultados foram concordantes com esses autores, além de demonstrar que *T. inkin* também apresentou

maior suscetibilidade para 5FC do que *T. asahii*. Os isolados de *T. faecale* apresentaram valores de CIM semelhantes aos de *T. asahii* para todos os fármacos. Para *T. dermatis*, as faixas de CIM foram menores do que para as outras espécies para ITZ, FCZ e AMB; a suscetibilidade para menores concentrações de FCZ já foi observada para esta espécie por outros autores (Wang *et al.*, 2012).

Em relação à suscetibilidade de *T. dermatis* à anfotericina B, não foram encontrados dados na literatura; no entanto, Lacasse e Cleveland (2009) relataram que *T. mucoides* foi sensível a menores valores de CIM para este fármaco, quando comparado às outras espécies. Como *T. mucoides* e *T. dermatis* pertencem ao mesmo clado, é possível que os perfis de suscetibilidade das duas espécies sejam semelhantes. Além disso, como é difícil a discriminação das duas espécies, mesmo por técnicas moleculares, há possibilidade de que os estudos tenham sido realizados com isolados de *T. mucoides* erroneamente identificados (que seriam na verdade *T. dermatis*) (Sugita, Ikeda e Nishikawa, 2004; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Gunn *et al.*, 2006; Chagas-Neto, 2007).

Embora nos laboratórios que realizam testes de suscetibilidade a antifúngicos, as metodologias utilizadas sejam as de referência (EUCAST ou CLSI), é importante avaliar a eficácia dos testes comerciais, pois, em geral, estes são menos trabalhosos e, se comprovada sua eficiência, podem ser aplicados mais facilmente em rotina laboratorial. O método de microdiluição *Sensititre YeastOne* é um teste comercial, que apresenta correlação com as metodologias de referência, variando de 75 a 100%, na dependência da associação antifúngico avaliado e espécies de leveduras (Cantón *et al.*, 2006; Magill *et al.*, 2006; Alexander *et al.*, 2007).

Na literatura, comparações entre os dois métodos têm demonstrado boa correlação quando as avaliações de suscetibilidade são realizadas para *Candida* spp. (Espinel-Ingroff *et al.*, 1999; Alexander *et al.*, 2007; Cuenca-Estrella *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2012). No entanto, neste trabalho, na comparação do método *Sensititre* ao EUCAST, observou-se que, em relação às CIMs, houve diferenças estatísticas significantes entre os valores, sendo frequentemente mais elevados para o método comercial. Acrescente-se a isso que, enquanto para EUCAST os valores de CIM para anfotericina B entre os dois grupos de isolados foram similares (faixa de resistência para a maioria das amostras), no método comercial esses valores, para os isolados de infecção invasiva, permaneceram na faixa de sensibilidade; para os isolados não

invasivos, os valores de CIM ficaram mais próximos aos do EUCAST. Deste modo, verificou-se discordância na categoria dos isolados, com 44% de erros graves e 53% de erros muito graves em relação a este fármaco. Ressalte-se que para FCZ e VCZ as porcentagens de erros graves também foram elevadas (**Tabela 12**).

O método comercial mostrou concordância essencial em relação ao EUCAST entre 64 a 81%, na dependência do fármaco avaliado (**Tabela 11**).

Esses dados sugerem que o método *Sensititre YeastOne* não poderia ser utilizado para avaliar a suscetibilidade de isolados clínicos de *Trichosporon* spp., pois os resultados induziriam a condutas terapêuticas inadequadas.

Entretanto, os testes de suscetibilidade *in vitro*, comerciais ou de referência, não estão padronizados para leveduras deste gênero. Portanto, apesar dos resultados discordantes, não se pode afirmar que o teste não seja adequado, apenas que necessita de melhor avaliação, por um maior número de pesquisadores, antes de ser empregado na rotina laboratorial.

As metodologias de referência para avaliação de suscetibilidade *in vitro* de leveduras têm possibilitado a determinação de CIM de fármacos antifúngicos para *Candida* e *Cryptococcus*. No entanto, critérios interpretativos clínicos estão estabelecidos apenas para o gênero *Candida*. Frente à inexistência de pontos de corte clínicos, valores de *cutoff* epidemiológicos para distintas espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* estão sendo propostos (Espinel-Ingroff *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2010; Espinel-Ingroff *et al.*, 2012). O objetivo desses *cutoffs* é separar isolados com mecanismos de resistência (não selvagens, *non wild types*) e isolados selvagens (*wild types*). Assim, proporcionam uma visão epidemiológica do perfil de suscetibilidade de cada espécie frente a um determinado antifúngico. Os resultados de suscetibilidade obtidos neste estudo podem contribuir para esse fim, em relação ao gênero *Trichosporon*, apesar do número reduzido de isolados avaliados para algumas espécies.

Pesquisas sobre os fatores de virulência em *Trichosporon* spp. têm sido conduzidas, dentre estes, a presença de GXM na parede celular, polissacarídeo que também está presente na cápsula de *C. neoformans* (Lyman *et al.*, 1995; Colombo, Padovan e Chaves, 2011). A relevância dos estudos sobre a síntese desse componente se dá pelo fato de que o mesmo pode influenciar na resposta imunológica dos pacientes (Lyman *et al.*, 1995; Zaragoza *et al.*, 2009).

A relação entre o conteúdo de GXM presente na parede celular de isolados de *Trichosporon* spp. e as formas de infecção, já foi demonstrada por outros autores, sendo que os isolados provenientes de formas invasivas apresentaram maior síntese do polissacarídeo na parede celular (Lyman *et al.*, 1995; Karashima *et al.*, 2002). Entretanto, no presente estudo, os isolados de infecção invasiva apresentaram intensidades de fluorescência variadas, algumas vezes com valores mais baixos quando comparados aos de isolados não invasivos (**Figura 11** e **Anexo F**). Os resultados indicaram que não houve diferença no conteúdo do polissacarídeo entre os dois grupos. Entretanto, até o momento não é possível estabelecer uma razão para a discordância de resultados com outros autores.

Alguns estudos têm demonstrado que, assim como em *Cryptococcus*, a síntese de GXM por *Trichosporon* spp. pode atenuar a ação de macrófagos contra as células da levedura (Ichikawa *et al.*, 2001; Karashima *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2009). Deste modo, como perspectiva de investigação sobre a função da GXM e de outros componentes da parede celular de *Trichosporon* spp. na relação patógeno-hospedeiro, ensaios de fagocitose devem ser conduzidos com os isolados deste estudo.

7. CONCLUSÕES

- *Trichosporon asahii* foi a espécie mais prevalente nas unidades hospitalares envolvidas no estudo, para os dois grupos de isolados. *Trichosporon inkin* foi a segunda espécie mais isolada dos casos de infecção invasiva;
- As observações morfológicas e avaliação de parâmetros fisiológicos não permitiram definir as espécies do gênero *Trichosporon*, e o sistema VITEK 2 apresentou discordância quando comparado à técnica molecular para as espécies não *T. asahii*. O método molecular identificou as espécies em 98,6% dos isolados do estudo, sendo que as sequências da região IGS1 foram mais adequadas para a discriminação;
- Em relação aos testes de suscetibilidade *in vitro*, VCZ foi o fármaco mais eficaz para a inibição das leveduras, enquanto para AMB, FCZ, 5FC e POS, os isolados foram suscetíveis somente a valores de CIM mais elevados;
- Diferenças significantes nos valores de CIM, bem como discordâncias na classificação categórica dos isolados, foram observadas para o método comercial em relação ao de referência;
- A metodologia empregada no estudo permitiu a detecção de GXM na parede celular de *Trichosporon* spp.; entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre os isolados invasivos e não invasivos em relação à presença do polissacarídeo.

8. ANEXOS

Anexo A.

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 18/01/2011, **APROVOU ad-referendum** o Protocolo de Pesquisa nº **0776/10**, intitulado: **"IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA, MOLECULAR, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E EXPRESSÃO DE GLUCURONOXILOMANANA EM PAREDE CELULAR DO FUNGO EMERGENTE TRICHOSPORON SPP.: ANÁLISE DE ISOLADOS OBTIDOS EM PACIENTES COLONIZADOS E COM INFECÇÃO INVASIVA."** apresentado pelo Departamento de DERMATOLOGIA, conforme parecer anexo.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Gilda Maria Barbaro Del Negro**

Pesquisador (a) Executante: **Dulce Sachiko Yamamoto de Figueiredo**

CAPPesq, 18 de Janeiro de 2011

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Anexo B. Isolados de *Trichosporon* spp. e respectivas amostras clínicas obtidas de pacientes internados no HC-FMUSP e em outras unidades hospitalares do Estado de São Paulo.

Isolados de infecção invasiva			
Sigla	Paciente	Registro do paciente	Material
DLC 01	LMA	553313337A	Sangue
DLC 02	BGAS	6089706A	Líquido peritoneal
DLC 03	JOS	13741992I	Sangue
DLC 04	JCD	2025343H	Sangue
DLC 06	TFP	13479870F	Osso
DLC 07	AAS	6167308H	Tecido subcutâneo
DLC 08	WSM	13880045I	Sangue
DLC 10	JVLS	55725412G	Líquido peritonial
DLC 11	VBA	6052606C	Osso
DLC 12	RN de E	6152994C	Sangue
DLC 14	SJA	13795449I	Sangue
DLC 15	AA	13946443D	Sangue
DLC 16	RLA	516966F	Sangue
IAL 02	MMMS	01-17336-01	Sangue
IAL 03	SGC	01-47493-01	Sangue
IAL 04	GLS	01-70936-01	Sangue
IAL 05	RVR	01-84143-09	Sangue
IAL 06	JSS	07-3786-01	Líquor
IAL 07	JCFO	312 SP3/01	Sangue
IAL 11	RN de S	1934.1/11	Sangue
IAL 12	JSQ	1422 SP3/07	Sangue
Isolados não invasivos			
Sigla	Paciente	Registro do paciente	Material
DLC 09	EBC	13652410G	Urina
IAL 01	INP	01-16050-01	Urina
IAL 10	IPF	01-85962-01	Urina
IAL 13	SBS	1.42523	Urina
IAL 14	SBS	1.42524	Urina
IAL 15	JLO	1.42526	Urina
1A	LMA	55337337A	Urina
2A	MSA	55345718E	Urina
3A	JAS	5217858D	Urina
4A	AJN	55345678B	Urina
6A	ACF	13454581G	Urina
7A	DA	2379973C	Urina
8A	EMNS	13595748A	Urina
9A	MFS	5099589F	Urina
2B	RMM	4065156C	Urina
3B	MAOC	13602355B	Urina
4B	GH	31377079G	Urina
7B	SPM	3278253H	Urina

Isolados não invasivos			
Sigla	Paciente	Registro do paciente	Material
8B	HL	15003805	Urina
9B	OJC	5364797H	Urina
1C	VF	13474897G	Urina
2C	BPF	5272147H	Urina
3C	SJAF	55344733I	Urina
8C	s/d	70089918	Cateter
9C	CANC	13616142A	Urina
1D	RSP	13617050J	Urina
3D	RSM	13552514F	Urina
5D ¹	MM	77069230G	Urina
8D ¹	MM	77069230G	Urina
9D	CGO	3207905G	Urina
1E	LCN	5548392E	Urina
5E	AS	52566201	Urina
6E	MVFS	55908100I	Urina
9E	CIS	2863802H	Urina
2F	SAS	5298614H	Urina
3F	JMG	44106322I	Urina
4F	JSS	5155948G	Urina
5F	AMCS	3351974B	Urina
6F	DCS	2511270H	Urina
9F	JFS	5169781F	Urina
1G	MT	5285632C	Urina
2G	PSN	13685570D	Urina
3G	ALC	13631033I	Urina
8G	DCS	1364059F	Urina
1H	JM	2549474D	Urina
2H	JPC	5009908C	Urina
3H	BLR	55308372G	Urina
4H	EM	5215241D	Urina
5H	APL	55412063E	Urina
6H	AP	13636534G	Urina
8H	SF	5037415D	Urina
9H	AL	13577783G	Urina
1I	JD	5541343F	Urina
2I	SO	5271528H	Urina
5I	COS	13657531D	Urina
6I	JP	13658012B	Urina

¹ Isolados do mesmo paciente com intervalo superior a um mês; s/d = sem dados.

Isolados identificados como IAL (infecção invasiva e não invasivos) – diversas unidades hospitalares do Estado de São Paulo; Isolados identificados pela sigla DLC (infecção invasiva) e demais não invasivos – Hospital das Clínicas da FMUSP

Anexo C. Resultados dos testes de suscetibilidade pelo método EUCAST, expressos pelas CIMs dos fármacos em mg/L

Isolados de infecção invasiva	MIC (mg/L)					
	FCZ	ITZ	CTZ	VCZ	AMB	5-FC
DLC 02	64	0,5	0,06	0,03	2	0,12
DLC 03	1	0,25	0,5	0,03	0,5	4
DLC 04	4	0,06	1	0,12	8	8
DLC 06	4	0,25	0,5	0,06	4	1
DLC 07	16	0,25	0,5	0,06	4	1
DLC 10	0,12	0,03	0,06	0,06	0,5	4
DLC 11	4	0,12	0,06	0,06	4	2
DLC 12	16	0,5	0,5	0,12	8	16
DLC 14	8	0,25	0,5	0,12	0,5	4
DLC 15	2	0,06	0,06	0,03	2	4
DLC 16	2	0,25	1	0,06	1	4
IAL 02	4	0,5	0,5	0,12	8	32
IAL 03	2	0,12	0,25	0,03	2	16
IAL 04	2	0,12	0,25	0,03	8	8
IAL 05	64	0,06	1	1	8	16
IAL 06	64	0,12	1	0,5	8	16
IAL 07	8	0,12	0,5	0,06	2	16
IAL 11	4	0,12	1	0,06	4	16
IAL 12	4	0,25	0,5	0,12	4	4
Isolados não invasivos	MIC (mg/L)					
	FCZ	ITZ	CTZ	VCZ	AMB	5-FC
DLC 09	8	0,12	1	0,5	8	8
IAL 01	4	0,12	0,5	0,06	8	16
IAL 10	4	0,06	0,5	0,12	2	0,5
IAL 13	8	0,12	1	0,12	1	2
IAL 14	4	0,12	0,5	0,06	0,5	2
IAL 15	32	0,12	0,5	0,12	4	8
1A	16	0,12	1	0,25	2	16
2A	8	0,06	2	0,12	1	4
3A	4	0,12	0,5	0,12	1	4
4A	4	0,12	0,5	0,06	1	0,5
5A	64	0,06	1	1	8	16
7A	0,5	0,12	0,5	0,06	0,5	2
8A	8	0,12	0,5	0,06	8	16
9A	4	0,12	0,5	0,06	1	4
2B	8	0,25	0,5	0,12	2	8
3B	1	0,015	0,015	0,015	1	0,12
4B	0,25	0,06	0,5	0,03	2	16
8B	16	0,015	0,015	0,015	2	0,12
9B	16	0,12	0,5	0,12	4	16

Isolados não invasivos	MIC (mg/L)					
	FCZ	ITZ	CTZ	VCZ	AMB	5-FC
1C	8	0,12	1	0,06	4	2
2C	8	0,12	0,5	0,06	4	2
3C	2	0,06	0,06	0,03	0,5	0,5
8C	1	0,03	0,06	0,03	1	2
9C	8	0,12	0,5	0,12	2	8
1D	4	0,06	0,5	0,03	2	2
3D	4	0,12	0,12	0,06	2	2
5D	8	0,25	0,5	0,03	2	2
8D	8	0,06	0,5	0,12	8	1
9D	4	0,06	0,5	0,12	1	2
1E	1	0,25	2	0,015	1	2
5E	4	0,06	0,06	0,06	0,5	16
6E	8	0,06	1	0,12	4	16
9E	1	0,06	0,25	0,015	1	4
2F	2	0,06	0,5	0,06	2	1
3F	64	1	0,25	0,12	4	8
4F	2	0,06	0,5	0,03	2	1
5F	4	0,25	0,5	0,06	8	4
6F	4	0,12	0,5	0,06	4	2
9F	2	0,03	0,5	0,06	0,5	2
1G	4	0,12	0,5	0,06	2	0,25
2G	4	0,06	0,25	0,06	2	2
3G	8	0,25	0,25	0,12	4	2
8G	64	0,12	0,5	0,06	4	1
1H	1	0,06	0,5	0,06	4	2
2H	8	0,06	0,5	0,12	4	2
3H	4	0,06	0,5	0,12	1	8
4H	2	0,12	0,06	0,015	1	0,5
5H	2	0,25	1	0,12	2	2
6H	2	0,12	0,25	0,06	0,25	1
8H	4	0,5	0,5	0,12	4	16
9H	8	0,25	0,06	0,06	0,5	1
1I	4	0,12	0,5	0,06	4	2
2I	8	0,5	0,5	0,06	1	2
5I	8	0,06	2	0,12	2	2
6I	2	0,12	0,25	0,12	1	0,25

FCZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; CTZ = cetozonazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B;
5-FC = 5-fluocitosina

Anexo D. Resultados dos testes de suscetibilidade pelo método comercial *Sensititre YeastOne*, expressos pelas CIMs dos fármacos em mg/L

Isolados de infecção invasiva	MIC (mg/L)							
	FCZ	ITZ	CTZ	VCZ	AMB	5FC	POS	CAS
DLC 02	1	0,06	0,06	0,03	0,5	8	0,06	16
DLC 03	2	0,5	0,5	0,06	1	16	0,5	16
DLC 04	4	0,25	0,25	0,06	0,25	2	0,25	16
DLC 06	2	0,25	0,25	0,06	1	16	0,25	8
DLC 07	8	0,25	0,25	0,06	0,03	4	0,25	16
DLC 10	4	0,12	0,06	0,06	0,25	64	0,06	16
DLC 11	2	0,25	0,5	0,06	0,06	32	0,5	16
DLC 12	8	0,25	0,25	0,12	0,12	8	0,5	16
DLC 14	128	1	4	2	0,06	2	1	16
DLC 15	2	0,25	0,25	0,06	0,5	32	0,5	16
DLC 16	2	0,25	0,5	0,06	0,5	32	0,5	16
IAL 02	8	0,25	0,5	0,12	0,06	4	0,25	16
IAL 03	2	0,12	0,06	0,03	0,5	4	0,12	16
IAL 04	4	0,25	0,25	0,06	0,5	2	0,5	16
IAL 05	8	0,5	0,5	0,25	0,03	4	0,5	16
IAL 06	128	0,5	2	2	0,12	4	1	16
IAL 07	16	0,25	0,5	0,25	0,06	8	0,5	16
IAL 11	8	0,25	0,5	0,12	0,25	4	0,25	16
IAL 12	8	0,25	0,5	0,12	0,12	2	0,5	16
Isolados de infecção não invasiva	MIC (mg/L)							
	FCZ	ITZ	CTZ	VCZ	AMB	5FC	POS	CAS
DLC 09	32	0,5	1	0,5	0,06	4	0,5	16
IAL 01	8	0,25	0,5	0,12	0,12	4	0,5	16
IAL 10	8	0,25	0,5	0,12	0,03	4	0,25	16
IAL 13	16	0,5	0,5	0,25	0,06	4	0,5	16
IAL 14	8	0,25	0,5	0,12	0,06	2	0,5	16
IAL 15	8	0,25	0,5	0,12	0,06	2	0,25	16
1A	32	0,5	2	1	0,25	4	1	16
2A	64	1	16	1	2	2	1	16
3A	16	0,5	1	0,25	2	4	1	16
4A	32	0,5	2	0,5	2	4	1	16
6A	64	1	4	1	2	4	2	16
7A	8	0,5	0,5	0,12	0,5	2	0,5	16
8A	32	1	4	2	2	4	1	16
9A	16	0,5	1	0,25	2	4	1	16
2B	16	0,5	1	0,12	2	4	1	16
3B	16	0,5	1	0,25	2	4	1	16
4B	16	0,5	1	0,12	2	4	1	16
8B	16	0,5	1	0,12	2	2	0,5	16
9B	32	0,5	2	0,5	2	2	1	16
1C	2	0,06	0,06	0,03	0,12	32	0,06	16
2C	32	0,5	2	0,5	2	4	1	16
3C	32	0,5	2	0,5	2	4	1	16
8C	2	0,25	0,25	0,03	1	64	0,5	16

MIC (mg/L)								
Isolados de infecção não invasiva	FCZ	ITZ	CTZ	VCZ	AMB	5FC	POS	CAS
9C	256	1	4	1	2	4	2	16
1D	16	0,5	1	0,25	2	4	1	16
3D	16	0,5	1	0,25	2	2	1	16
5D	32	0,5	1	0,5	2	4	1	16
8D	32	0,5	2	0,5	2	4	1	16
9D	16	0,5	0,5	0,25	2	4	0,5	16
1E	16	0,5	1	0,12	2	2	1	16
5E	8	0,5	0,5	0,12	0,5	2	0,5	16
6E	32	1	16	0,25	2	8	2	16
9E	4	1	1	0,06	1	64	1	16
2F	16	0,5	1	0,25	2	4	1	16
3F	16	1	1	0,5	2	8	2	16
4F	16	0,5	1	0,25	2	8	1	16
5F	32	2	1	0,25	2	16	2	16
6F	16	1	0,5	0,25	1	4	1	16
9F	8	0,5	1	0,12	2	4	1	16
1G	16	0,5	1	0,5	2	4	1	16
2G	16	0,5	1	0,25	0,5	4	1	16
3G	32	0,5	1	0,5	2	2	1	16
8G	4	0,12	0,12	0,06	0,12	0,5	0,5	16
1H	16	0,5	1	0,12	2	2	1	16
2H	32	0,5	1	0,12	2	4	1	16
3H	32	0,5	1	0,25	0,25	4	1	16
4H	16	0,5	1	0,12	0,5	4	0,5	16
5H	32	0,5	1	0,12	2	4	1	16
6H	16	0,5	1	0,12	2	2	1	16
8H	16	1	1	0,12	1	4	0,5	16
9H	8	0,25	0,5	0,12	1	8	0,5	16
1I	16	0,5	1	0,12	2	2	1	16
2I	32	0,5	2	0,5	2	4	1	16
5I	16	0,5	1	0,12	0,5	2	0,5	16
6I	32	0,5	1	0,12	1	4	1	16

FCZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; CTZ = cetonazol; VCZ = voriconazol; AMB = anfotericina B; 5FC = 5-fluocitosina; POS = posaconazol; CAS = caspofungina

Anexo E. Valores de CIM (mg/L) obtidos pelo método EUCAST, de acordo com as espécies de *Trichosporon* do estudo

CIM (mg/L) de ITZ										
ESPÉCIE	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
<i>T. asahii</i>	2	1	19	25	10	4	1	0	0	0
<i>T. inkin</i>	0	1	2	1	3	1	0	0	0	0
<i>T. faecale</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>T. dermatis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
CIM (mg/L) de CTZ										
ESPÉCIE	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
<i>T. asahii</i>	2	0	4	1	5	36	11	3	0	0
<i>T. inkin</i>	0	0	4	0	1	2	1	0	0	0
<i>T. faecale</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>T. dermatis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
CIM (mg/L) de VCZ										
ESPÉCIE	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
<i>T. asahii</i>	4	5	24	24	1	2	2	0	0	0
<i>T. inkin</i>	1	4	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. faecale</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. dermatis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
CIM (mg/L) de AMB										
ESPÉCIE	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
<i>T. asahii</i>	0	0	0	0	1	7	12	16	15	11
<i>T. inkin</i>	0	0	0	0	0	1	3	2	2	0
<i>T. faecale</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>T. dermatis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CIM (mg/L) de FCZ										
ESPÉCIE	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>T. asahii</i>	0	1	1	3	8	21	18	5	1	4
<i>T. inkin</i>	0	0	0	3	2	2	0	0	0	1
<i>T. faecale</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>T. dermatis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CIM (mg/L) de 5-FC										
ESPÉCIE	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>T. asahii</i>	2	2	4	6	20	6	7	14	1	0
<i>T. inkin</i>	1	0	0	1	2	4	0	0	0	0
<i>T. faecale</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>T. dermatis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Obs.: Isolado IAL 04 não foi incluído na tabela.

Anexo F. Valores de intensidade de fluorescência de GXM obtidos com o anticorpo monoclonal anti-GXM, de acordo com os isolados de *Trichosporon* spp..

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMINISTRATION, U. F. A. D. **Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems; guidance for industry and FDA. Food and Drug Administration.** Rockville, MD: US Food and Drug Administration 2009.

AHMAD, S.; AL-MAHMEED, M.; KHAN, Z. U. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. **J Med Microbiol**, v. 54, n. Pt 7, p. 639-46, Jul 2005. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947428> >.

ALEXANDER, B. D. et al. Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 698-706, Mar 2007. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202279> >.

ANAISSIE, E. et al. Azole therapy for trichosporonosis: clinical evaluation of eight patients, experimental therapy for murine infection, and review. **Clin Infect Dis**, v. 15, n. 5, p. 781-7, Nov 1992. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1445976> >.

ANDO, M. et al. 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 patients' homes. **J Allergy Clin Immunol**, v. 85, n. 1 Pt 1, p. 36-44, Jan 1990. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2299104> >.

ARAÚJO RIBEIRO, M. et al. Molecular identification and susceptibility testing of *Trichosporon* isolates from a Brazilian hospital. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 4, p. 221-5, Dec 2008. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19071890> >.

ARENDROP, M. C. et al. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 7, p. E246-7, Jul 2012. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563750> >.

ARIKAN, S.; HASÇELİK, G. Comparison of NCCLS microdilution method and Etest in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 43, n. 2, p. 107-11, Jun 2002. ISSN 0732-8893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088616> >.

ASADA, N. et al. Successful treatment of breakthrough *Trichosporon asahii* fungemia with voriconazole in a patient with acute myeloid leukemia. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 4, p. e39-41, Aug 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16838224> >.

BAYRAMOĞLU, G. et al. Breakthrough *Trichosporon asahii* fungemia in neutropenic patient with acute leukemia while receiving caspofungin. **Infection**, v. 36, n. 1, p. 68-70, Feb 2008. ISSN 0300-8126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882360> >.

BAŠKOVÁ, L.; BUCHTA, V. Laboratory diagnostics of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 57, n. 5, p. 421-30, Sep 2012. ISSN 1874-9356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566119> >.

BENTUBO, H. D. L. **Leveduras do gênero *Trichosporon*: aspectos ecológicos, caracterização laboratorial, fatores associados à virulência e suscetibilidade a antifúngicos.** [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo 2008.

CANTÓN, E. et al. [Evaluation and utility of the E-test and Neo-Sensitabs methods in studying fluconazole yeast susceptibility]. **Rev Esp Quimioter**, v. 19, n. 3, p. 267-74, Sep 2006. ISSN 0214-3429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17099795> >.

CHAGAS-NETO, T. C. **Caracterização microbiológica de isolados clínicos de *Trichosporon* spp.** [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina 2007.

CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166, n. 3, p. 121-32, Sep 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568419> >.

CHANG, M. R. et al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 50, n. 5, p. 265-8, 2008 Sep-Oct 2008. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949342> >.

CHEN, Y. C. et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 11, p. 4042-51, Nov 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682528> >.

CHRYSSANTHOU, E. Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: comparison of the E-test and the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the NCCLS M27-A reference method. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 11, p. 4181-3, Nov 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682555> >.

CLSI. **Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; Approved Guideline.** CLSI document MM18-A. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008a.

_____. **Reference method broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard - Third Edition.** CLSI document M27-A3. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008b.

_____. **Reference method broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Fourth Informational Supplement.** CLSI document M27-S4. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 682-700, Oct 2011. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976604> >.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on

Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1782-6, May 2010. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20220169> >.

_____. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of candida species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 11, p. 3644-7, Nov 2002. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384382> >.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. **Clin Microbiol Infect**, v. 7 Suppl 2, p. 46-53, 2001. ISSN 1198-743X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525218> >.

DASBACH, E. J.; DAVIES, G. M.; TEUTSCH, S. M. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 6, p. 1524-8, Dec 2000. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11096031> >.

DATTA, K.; PIROFSKI, L. A. Towards a vaccine for *Cryptococcus neoformans*: principles and caveats. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 525-36, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696648> >.

DE BAERE, T. et al. Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region (ITS2). **BMC Microbiol**, v. 2, p. 21, Jul 2002. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139769> >.

DE HOOG, G. S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2th. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2002. 1126 ISBN 90-70351-43-9.

DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. **Clin Infect Dis**, v. 26, n. 4, p. 781-803; quiz 804-5, Apr 1998. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564455> >.

DIAZ, M. R.; FELL, J. W. High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *trichosporon*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 8, p. 3696-706, Aug 2004. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15297519> >.

ELLNER, K. et al. Prevalence of *Trichosporon beigelii*. Colonization of normal perigenital skin. **J Med Vet Mycol**, v. 29, n. 2, p. 99-103, 1991. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1880685> >.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of In vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 10, p. 2950-6, Oct 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738049> >.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 11, p. 5898-906, Nov 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22948877> >.

_____. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 9, p. 3251-7, Sep 2010. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592159> >.

_____. Multicenter comparison of the sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the National Committee for Clinical Laboratory standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 591-5, Mar 1999. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9986817> >.

EUCAST. Antifungal Agents - Breakpoint table for interpretation of MICs. Version 6.1. Växjö, Sweden: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2013.

FONSECA, F. L. et al. Structural and functional properties of the *Trichosporon asahii* glucuronoxylomannan. **Fungal Genet Biol**, v. 46, n. 6-7, p. 496-505, 2009 Jun-Jul 2009. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19285564> >.

FOURNIER, S. et al. Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukaemia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 21, n. 12, p. 892-6, Dec 2002. ISSN 0934-9723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525928> >.

GARCÍA-MARTOS, P. et al. [Antifungal susceptibility of emerging yeast pathogens]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 19, n. 6, p. 249-56, 2001 Jun-Jul 2001. ISSN 0213-005X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11440661> >.

GIRMENIA, C. et al. 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, n. 4, p. 1818-28, Apr 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15815003> >.

GUNN, S. R. et al. Use of DNA sequencing analysis to confirm fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a pediatric patient. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 1175-7, Mar 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517924> >.

GUO, L. N. et al. Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 11, p. 3805-11, Nov 2011. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900517> >.

GUÉHO, E.; DE HOOG, G. S.; SMITH, M. T. Neotypification of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 61, n. 4, p. 285-8, May 1992. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1497333> >.

GUÉHO, E. et al. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 2, p. 175-89, Feb 1993. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8259834> >.

_____. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**, v. 37, n. 1-2, p. 3-10, 1994 Jan-Feb 1994. ISSN 0933-7407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935589> >.

HASHINO, S. et al. Fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a patient with refractory Burkitt's leukemia. **Blood Res**, v. 48, n. 2, p. 154-6, Jun 2013. ISSN 2287-979X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826589> >.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 462-78, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665465> >.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 4, p. 469-88, Oct 1996. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894347> >.

ICHIKAWA, T. et al. Structural studies of a cell wall polysaccharide of *Trichosporon asahii* containing antigen II. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 19, p. 5098-106, Oct 2001. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11589701> >.

JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. C. Phenotypic Switching in Fungi. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 2, n. 3, p. 180-188, Sep 2008. ISSN 1936-3761. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19768140> >.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 1, p. 120-8, Jan 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171227> >.

KARASHIMA, R. et al. Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in *Trichosporon asahii* by repeated passage in mice. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 5, p. 423-32, May 2002. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990495> >.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts : a taxonomic study**. 5th. Amsterdam ; New York: Elsevier Science, 2011. 2354 ISBN 0444521496. Disponível em: < <http://www.elsevier.com/books/the-yeasts/kurtzman/978-0-444-52149-1#> >.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 5, p. 1216-23, May 1997. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9114410> >.

LACASSE, A.; CLEVELAND, K. O. *Trichosporon mucoides* fungemia in a liver transplant recipient: case report and review. **Transpl Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 155-9, Apr 2009. ISSN 1399-3062. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18983414> >.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9th. São Paulo: Savier, 2009. 1120 ISBN 8573781238.

LIAO, Y. et al. Breakthrough trichosporonosis in patients receiving echinocandins: case report and literature review. **Chin Med J (Engl)**, v. 125, n. 14, p. 2632-5, Jul 2012. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882952> >.

LYMAN, C. A. et al. 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, n. 1, p. 126-30, Jan 1995. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535310> >.

LYMAN, C. A.; WALSH, T. J. Phagocytosis of medically important yeasts by polymorphonuclear leukocytes. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1489-93, Apr 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132358> >.

MAGALHÃES, A. R. et al. Morphological and biochemical characterization of the aetiological agents of white piedra. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 786-90, Dec 2008. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148418> >.

MAGILL, S. S. et al. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 529-35, Feb 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455909> >.

MAKIMURA, K. et al. Comparative evaluation of standard dilution method and commercial kit for frozen plate antifungal susceptibility testing of yeasts using 200 clinical isolates. **Microbiol Immunol**, v. 48, n. 10, p. 747-53, 2004. ISSN 0385-5600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15502407> >.

MATSUE, K. et al. Breakthrough trichosporonosis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 6, p. 753-7, Mar 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16477548> >.

MCNEIL, M. M. et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 5, p. 641-7, Sep 2001. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11486286> >.

MELCHER, G. P. et al. Demonstration of a cell wall antigen cross-reacting with cryptococcal polysaccharide in experimental disseminated trichosporonosis. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 1, p. 192-6, Jan 1991. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1993757> >.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 142-51, Feb 2011. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272794> >.

MIDDELHOVEN, W. J.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 3, p. 975-86, May 2004. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143052> >.

MOOTY, M. Y. et al. A case of *Trichosporon beigeli* endocarditis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 20, n. 2, p. 139-42, Feb 2001. ISSN 0934-9723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11305471> >.

MORACE, G. et al. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the national committee for clinical laboratory standards m27-a broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 8, p. 2953-8, Aug 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149358> >.

MORETTI-BRANCHINI, M. L. et al. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 39, n. 3, p. 161-4, Mar 2001. ISSN 0732-8893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337182> >.

MOTTA, A. L. **Análise da prevalência e perfil de suscetibilidade das espécies de *Candida* isoladas de hemoculturas em 2006 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 2009.

NAKAGAWA, T. et al. Trichosporon cutaneum (Trichosporon asahii) infection mimicking hand eczema in a patient with leukemia. **J Am Acad Dermatol**, v. 42, n. 5 Pt 2, p. 929-31, May 2000. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767708> >.

O'GORMAN, C. et al. Trichosporon asahii. Blood-stream infection in a non-cancer patient receiving combination antifungal therapy. **Ulster Med J**, v. 75, n. 3, p. 226-7, Sep 2006. ISSN 0041-6193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16964817> >.

ODABASI, Z. et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. **Clin Infect Dis**, v. 39, n. 2, p. 199-205, Jul 2004. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15307029> >.

PAGNOCCA, F. C. et al. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of Trichosporon chiarellii sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, n. Pt 6, p. 1454-9, Jun 2010. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671730> >.

PAPHITOU, N. I. et al. In vitro antifungal susceptibilities of Trichosporon species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 4, p. 1144-6, Apr 2002. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897610> >.

PFALLER, M. A. et al. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and Candida: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Resist Updat**, v. 13, n. 6, p. 180-95, Dec 2010. ISSN 1532-2084. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050800> >.

_____. Validation of 24-hour fluconazole MIC readings versus the CLSI 48-hour broth microdilution reference method: results from a global Candida antifungal surveillance program. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 11, p. 3585-90, Nov 2008. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784314> >.

_____. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against Candida spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 4, p. 365-8, Aug 2012. ISSN 1879-0070. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22726528> >.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 133-63, Jan 2007. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223626> >.

PFALLER, M. A. et al. Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeasts and moulds in a global antifungal surveillance programme. **Mycopathologia**, v. 174, n. 4, p. 259-71, Oct 2012. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580756> >.

QUINDÓS, G. et al. In-vitro activity of 5-fluorocytosine against 1,021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts. **Rev Iberoam Micol**, v. 21, n. 2, p. 63-9, Jun 2004. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15538829> >.

RAMANI, R. et al. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 11, p. 3396-8, Nov 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774605> >.

REVANKAR, S. G. et al. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 153-6, Jan 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431939> >.

REX, J. H. et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 643-58, table of contents, Oct 2001. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585779> >.

RODRIGUES, G. A. S. et al. [Nosocomial infection due to *Trichosporon asahii*: clinical revision of 22 cases]. **Rev Iberoam Micol**, v. 23, n. 2, p. 85-9, Jun 2006. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854183> >.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 10, p. 4026-34, Oct 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16189076> >.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 2, p. 400-4, Feb 2000. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639369> >.

RUAN, S. Y.; CHIEN, J. Y.; HSUEH, P. R. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 1, p. e11-7, Jul 2009. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19489711> >.

SALAZAR, G. E.; CAMPBELL, J. R. Trichosporonosis, an unusual fungal infection in neonates. **Pediatr Infect Dis J**, v. 21, n. 2, p. 161-5, Feb 2002. ISSN 0891-3668. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11840086> >.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 396 ISBN 8527708663.

SILVESTRE JUNIOR, A. M. **Sistemática molecular de *Trichosporon* spp. baseada em genes ribossomais e sua correlação com fatores de virulência e epidemiologia**. [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina 2009.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Molecular fingerprints to identify *Candida* species. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 923742, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844370> >.

STEVENSON, L. G. et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. **J Clin**

Microbiol, v. 48, n. 10, p. 3482-6, Oct 2010. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668126> >.

SUGITA, T.; IKEDA, R.; NISHIKAWA, A. Analysis of Trichosporon isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 12, p. 5467-71, Dec 2004. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583267> >.

SUGITA, T. et al. Trichosporon species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 11, p. 7626-9, Nov 2005. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269819> >.

_____. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of Trichosporon species. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 5, p. 1826-30, May 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980969> >.

_____. A nested PCR assay to detect DNA in sera for the diagnosis of deep-seated trichosporonosis. **Microbiol Immunol**, v. 45, n. 2, p. 143-8, 2001. ISSN 0385-5600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11293480> >.

_____. Taxonomic position of deep-seated, mucosa-associated, and superficial isolates of Trichosporon cutaneum from trichosporonosis patients. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 1368-70, May 1995. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615757> >.

TAPIA P, C. Género Trichosporon. **Revista chilena de infectología**, v. 26, p. 263-264, 2009. ISSN 0716-1018. Disponível em: < http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000400010&nrm=iso >.

TORIUMI, Y. et al. Antifungal pharmacodynamic characteristics of amphotericin B against Trichosporon asahii, using time-kill methodology. **Microbiol Immunol**, v. 46, n. 2, p. 89-93, 2002. ISSN 0385-5600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11939583> >.

UPTON, A. et al. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 4, p. 531-40, Feb 2007. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17243056> >.

VAN BURIK, J. A. et al. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. **Med Mycol**, v. 36, n. 5, p. 299-303, Oct 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075499> >.

VANDEPUTTE, P. et al. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of Candida glabrata. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 10, p. 3701-9, Oct 2008. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694952> >.

VAZQUEZ, J. Trichosporon Infection. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 1, p. 52-58, 2010. ISSN 1936-3761. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12281-010-0005-y> >.

WALSH, T. J. et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clin Microbiol Infect**, v. 10 Suppl 1, p. 48-66, Mar 2004. ISSN 1198-743X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14748802> >.

_____. Experimental Trichosporon infection in persistently granulocytopenic rabbits: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of an emerging opportunistic mycosis. **J Infect Dis**, v. 166, n. 1, p. 121-33, Jul 1992. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1535092> >.

_____. Trichosporon beigeli, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1616-22, Jul 1990. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2380383> >.

WANG, H. et al. In vitro susceptibilities of yeast species to fluconazole and voriconazole as determined by the 2010 National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) study. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 12, p. 3952-9, Dec 2012. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23035204> >.

WOLF, D. G. et al. Multidrug-resistant Trichosporon asahii infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 12, p. 4420-5, Dec 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724855> >.

ZARAGOZA, O. et al. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 4, p. 1563-70, Apr 2011. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245438> >.

_____. The capsule of the fungal pathogen Cryptococcus neoformans. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426855> >.

ZHANG, E. et al. The opportunistic yeast pathogen Trichosporon asahii colonizes the skin of healthy individuals: analysis of 380 healthy individuals by age and gender using a nested polymerase chain reaction assay. **Microbiol Immunol**, v. 55, n. 7, p. 483-8, Jul 2011. ISSN 1348-0421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707737> >.