JOÃO NOBREGA DE ALMEIDA JÚNIOR

**Padronização da espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de
cepas de *Trichosporon* spp. de importância médica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

Co-orientadora: Profa. Dra. Gilda Maria
Barbaro Del Negro

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida Júnior, João Nobrega

Padronização da espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de cepas de *Trichosporon* spp. de importância médica / João Nobrega de Almeida Júnior. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Patologia.

Orientador: Gil Benard.

Coorientadora: Gilda Maria Barbaro Del Negro.

Descritores: 1.*Trichosporon* spp 2.Micoses/diagnóstico 3.Tipagem molecular 4.Proteômica 5.Espectrometria de massas por ionização e dessorção

USP/FM/DBD-028/14

DEDICATÓRIA

As minhas mulheres:

Alice que me apoiou e que também batalhou até o último momento. Alice é meu equilíbrio, meu trilha da boa escolha, minha luz na escuridão. Antes de conhecê-la o horizonte me era um estranho distante. Ela me fez enxergá-lo de outra maneira.

Julie, minha filha que enfrentou toda esta aventura como uma verdadeira guerreirinha. Enfrentou o frio longe de casa e dos parentes, foi à escola e aprendeu uma nova língua. Nunca me esquecerei dos dias que ia buscá-la na escola situada na rua *Georges Desplas*. Ficava alguns segundos admirando-a pela janela antes de soar o interfone, em minha cabeça ressoava: “esta é minha filha, obrigado meu Deus!”.

Nicole. Viajante inesperada. Concebida em fevereiro de 2013, em meio a um inverno longo e rigoroso. Foi o grande resultado de toda esta odisséia familiar.

AGRADECIMENTOS

A Deus: senti-me guiado por suas mãos em diversos momentos durante o andamento deste projeto. Rezei muitas vezes para conseguir obter forças e seguir até o final. Não deixei de fazê-lo até nos momentos que precederam a defesa desta tese.

Aos meus pais: sou fruto da jovialidade, coragem, fé e amor de meus pais. Ainda aos vinte anos, durante os últimos dias de uma seção de quimioterapia, minha mãe foi surpreendida pela notícia dada pelo pai, na época ainda estudante de medicina: estava grávida. Os oncologistas carentes de evidências da evolução de um teratocarcinoma frente a explosão hormonal produzida pela gestação foram firmes na decisão da interrupção. Por outro lado, Dr Antonio Rosas, obstetra e professor titular da Disciplina de Obstetrícia da PUC-SP, deixou a decisão final para meus pais. Dois anos depois viria ao mundo meu irmão Thiago e minha irmã Camila nasceu em 1982.

Ao meu avô João Nobrega de Almeida Neto deixo meus eternos agradecimentos. Custeou os estudos dos quatro filhos apesar de dificuldades financeiras importantes. Foi o profeta da família. Seus filhos viraram profissionais de renome. Meu pai especializou-se em cardiologista e durante minha graduação discutia os diferentes estudos de impacto na área, semeando em meu ser o espírito acadêmico.

Registro homenagem póstuma a meu avô Rubens de Faria e Souza que lecionou em diferentes instituições do Estado de São Paulo. Lamento não tê-lo conhecido e ter perdido a oportunidade de discutir detalhes da extinta União Soviética, com a qual mantia relações não reveladas para a família.

Aos meus sogros, Siang Wun Song e Ping Ping Fan Song que nos ajudaram muito a concretizar este projeto. Os meses que dividimos juntos em Paris foi muito especial !

Aos colegas do Instituto de Infectologia Emílio Ribas que muito me ensinaram durante os três anos de residência.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e a todo corpo docente deixo registrado eterno reconhecimento e espero ter retribuído um pouco do que aprendi com este trabalho.

Aos meus colegas da Divisão de Laboratório Central que sempre me incentivaram para batalhar por um doutorado.

Aos meus colegas do Serviço de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central que sempre me ajudaram.

Ao Professor Alberto José da Silva Duarte que sempre me apoiou e ajudou nas horas de dificuldade. Além de ser o principal incentivador.

À Adriana, micologista de mão cheia, que abriu a primeira porta e à Flávia Rossi que acendeu as luzes para os caminhos antes escuros da Microbiologia Médica.

Às micologistas Dulce Sachiko Y. Figueiredo, Sandra Vellaisamy, Dominique Rocherolle, Maria Isabel da Cunha Pinto, Regina Reinhoz Botelho, muito obrigado!

Ao Professor Raymundo Azevedo e a Thiago Rezende da Pós-Graduação do Departamento de Patologia da FMUSP pela excelência do suporte prestado.

Agradeço de forma especial meus orientadores, Doutor Gil Benard, Professor Christophe Hennequin e Doutora Gilda Maria Barbaro del Negro que acreditaram, apoiaram e lapidaram minhas idéias que agora estão registradas neste documento.

*A mes amis du Laboratoire de Parasitologie et Micologie de l'hôpital Saint-Antoine:
Nous avons vécu une année inoubliable. Je me sentais chez moi grâce à votre accueil
chaleureux. Vous me manquerez toujours. Tout s'est passé très vite, comme le cours de
la vie. Merci infiniment.*

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2011/08911-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PDSE 0324-12-4) pelo apoio financeiro.

“Le hasard ne favorise l’invention que pour des esprits préparés aux découvertes par de patientes études et de persévérants efforts”

Louis Pasteur

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese 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 Histórico e Taxonomia do gênero <i>Trichosporon</i>	1
1.2 Epidemiologia das infecções invasivas por <i>Trichosporon</i> spp.....	2
1.3 Diagnóstico.....	3
1.4 Espectrometria de Massa MALDI-TOF.....	5
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	11
4. ARTIGOS.....	12
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES.....	38
7. ANEXOS	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CBS	<i>Centraalbureau von Schimmelcultures</i>
CHCA	ácido- α -ciano-4-hidroxicinâmico
CIP	<i>parsimony informative characters</i>
D	daltons
DLC	Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
EM	espectro de massa
ER	espectro de referência
EUA	Estados Unidos da América
ICHC	Instituto Central do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICr	Instituto da Criança do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICS	infecção de corrente sanguínea
ID	<i>identification</i>
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IFI	Infecção Fúngica Invasiva
IGS1	<i>intergenic spacer</i> entre as regiões 28S e 5S do DNA ribossomal
INCOR	Instituto de Coração do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IOT	Instituto de Ortopedia do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IPQ	Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ITS1	<i>internal transcriber spacer</i> entre as regiões 18S e 5.8S do DNA ribossomal
LS	<i>logscore</i>
MALDI	<i>mass assisted laser desorption/ionization</i>
MSP	<i>main spectrum</i>
NPQ	neutropenia pós quimioterapia
SDA	água Sabouraud dextrose

SM	espectrometria de massa
TOF	<i>time of flight</i>
TOS	transplantados de órgão sólido
UV	comprimento de onda ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos que utilizaram espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de <i>Trichosporon</i> spp.	9
---	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Artroconídeos visualizados em microscopia de contraste de fase (adaptado de: Taj-Aldeen S.J. et al., 2009).	1
Figura 2. Colônias de <i>Trichosporon</i> em placa de meio Sabouraud após 96 horas, lisas, (a) e 45 dias, cerebriformes (b), à 37°C. (adaptado de: Taj-Aldeen S.J. et al., 2009).....	4
Figura 3. Regiões variáveis DNA ribossomal pra identificação de <i>Trichosporon</i> : internal transcriber spacer (ITS) e intergenic spacer (IGS).	5
Figura 4. Após depósito dos analitos na placa metálica (ex. alçada de colônias de bactérias, leveduras), é aplicada a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Nota-se a formação dos cristais formados pela combinação do analito com a matriz (fonte: https://www.ms-textbook.com).	6
Figura 5. Princípios da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF) (Adaptado de: Croxatto A et al., 2012).	7
Figura 6. Plataformas de espectrometria de massa MALDI-TOF para disponíveis no mercado nacional: A) VITEK MS (BioMérieux, França); B) Microflex LT® (Bruker Daltonics/BD, Alemanha/EUA).	8

RESUMO

Almeida Júnior, J.N. Padronização da espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de cepas de *Trichosporon* spp. de importância médica (Tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O gênero *Trichosporon* é composto por leveduras artrosporadas do Filo Basidiomycota e é conhecido agente de infecção fúngica invasiva (IFI) em pacientes imunodeprimidos ou com outros fatores de risco. Em pacientes onco-hematológicos é a principal levedura responsável por IFI depois do gênero *Candida*. Entre as espécies responsáveis por infecções no homem encontram-se: *T. asahii*, *T. inkin*, *T. mucoides*, *T. dermatis*, *T. jirovecii*, *T. ovoides*, *T. cutaneum*, *T. montevidense*, *T. domesticum*, *T. asteroides*, *T. coremiiforme*, *T. faecale*, *T. dohaense*, *T. lactis*, *T. japonicum*. A tecnologia de identificação de fungos por espectrometria de massa (SM) MALDI-TOF ainda carece de padronização para identificação de fungos do gênero *Trichosporon*, mas a literatura mostra resultados encorajadores. O objetivo deste estudo é padronizar a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF para a identificação das espécies do gênero *Trichosporon* de importância médica. O estudo foi realizado em cooperação entre a Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC, HC-FMUSP), Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP), Instituto Adolfo Lutz (IAL) e *Laboratoire de Parasitologie-Mycologie* do Hospital Saint Antoine de Paris, vinculado ao grupo de pesquisa INSERM/UPMC UMR S945 “Immunité et Infection” *Faculté de Médecine et Université Pierre et Marie Curie* de Paris. Noventa e três cepas/isolados foram analisado(a)s, sendo dezenove cepas de referência adquiridas junto à coleção holandesa *Centraalbureau Schimmelcultures* (CBS), 19 isolados do HC-FMUSP e IAL, e 55 isolados de diferentes hospitais franceses. A identificação molecular foi realizada através do sequenciamento da região IGS1 do rDNA e foi considerada como método de referência. O protocolo de extração de proteínas foi estabelecido através da comparação do desempenho de três metodologias (Bruker®, Cassagne *et al.*, Sendid *et al.*). Os espectros de massa foram obtidos no laboratório de bacteriologia do Hospital Saint Antoine de Paris através do aparelho Microflex LT®. A interpretação dos resultados qualitativos e quantitativos (*logscore*) foi realizada através do Software Biotyper 3.0®. O desempenho de identificação do banco de espectros de referência Biotyper 3.0® foi comparado a outros cinco bancos criados a partir de espectros de referência (ERs) derivados de 18 cepas de referência CBS, sete isolados clínicos e 11 ERs do banco Biotyper 3.0. O protocolo de extração de proteínas descrito por Sendid *et al.* foi escolhido como protocolo de referência pois os espectros produzidos tiveram *logscore* superiores àqueles obtidos através do método do fabricante. O banco de ERs Biotyper 3.0® apresentou 32,3% de identificações corretas das espécies, sendo que o banco de ERs *in house* (número 5, constituído cepas CBS e isolados clínicos) apresentou 98,5% de identificações de espécies. Espectros de referência do banco de dados Biotyper 3.0® foram submetidos à identificação com a utilização dos ERs criados a partir de cepas CBS e isolados clínicos e foram evidenciados com erros de identificação: *T. mucoides* (2), *T. ovoides* (1) e *T. cutaneum* (2). Após padronização do protocolo de extração e criação de banco de ERs com cepas CBS e isolados clínicos caracterizados pelo sequenciamento da região IGS, a SM por MALDI-TOF apresentou-se como potente uma ferramenta para a identificação de fungos do gênero *Trichosporon*. O banco de ERs Biotyper 3.0® apresentou um fraco

desempenho, relacionado a ERs que foram criados a partir de cepas mal identificadas.

Descritores: *Trichosporon spp*, micoses/diagnóstico, tipagem molecular, proteômica, espectrometria de massas por ionização e dessorção.

SUMMARY

Almeida Júnior, J.N. Standardization of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of *Trichosporon* spp of medical relevance (thesis). São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Trichosporon spp. are arthrospored yeasts from the Filum Basidiomycota that are known to produce invasive fungal infection (IFI) in patients with immunosuppression or other risk factors. After *Candida*, *Trichosporon* is the second genus of yeasts responsible for IFI in patients with onco-hematological diseases. The most important species related to human infection are: *T. asahii*, *T. inkin*, *T. mucoides*, *T. dermatis*, *T. jirovecii*, *T. ovoides*, *T. cutaneum*, *T. montevidense*, *T. domesticum*, *T. asteroides*, *T. coremiiforme*, *T. faecale*, *T. dohaense*, *T. lactis*, *T. japonicum*. The technology of mass spectrometry (MS) for identification of *Trichosporon* species has not yet been standardized. However, preliminary promising results can be found in the literature. The objective of this study is to analyse and validate MS MALDI-TOF for the identification of *Trichosporon* species of medical relevance. This was a multicentric study with collaboration from the Central Laboratory Section from Clinics Hospital of the Medical School from the University of São Paulo (DLC-HCFMUSP), Tropical Medicine Institute from the University of São Paulo (IMT-USP), Instituto Adolfo Lutz (IAL) and *Laboratoire de Parasitologie-Mycologie* from the Hospital Saint Antoine of Paris and INSERM/UPMC UMR S945 “Immunité et Infection”, *Faculté de Médecine et Université Pierre et Marie Curie* of Paris. Ninety three strains/isolates belonging to sixteen *Trichosporon* species were analysed. Nineteen were purchased from *Centraalbureau Schimmelcultures* (CBS) yeast collection, 19 belonged to HC-FMUSP and IAL collections, 55 belonged to different French collections. The reference identification method was the IGS1 rDNA sequencing. A protein extraction protocol was first established after comparing the performance of three different methodologies (Bruker™, Cassagne *et al.*, Sendid *et al.*). The mass spectra were obtained through a Microflex LT™ mass spectrometer located at the bacteriology laboratory from Saint Antoine Hospital, Paris. Mass spectra, qualitative and quantitative results were produced through the software Biotyper 3.0™. The performance of the original main spectrum (MSP) library was compared to other 5 *in house* libraries built with the combination of MSPs derived from CBS strains (18), clinical strains (7) or (Bruker Daltonics/BD, Germany/USA) (11). The extraction protocol described by Sendid *et al.* showed better performance when compared to the manufacturer’s one and was chosen for the subsequent extractions. Among the 6 different reference spectra databases tested, a specific one composed of 18 reference strains plus 7 clinical isolates (database 5) allowed the correct identification of 66 amongst 67 clinical isolates (98,5%). Biotyper 3.0 library produced only 32,3% of correct identifications. Biotyper’s MSPs were submitted to cross-identification with MSPs derived from CBS strains and clinical isolates and misidentified original MSPs were identified: *T. mucoides* (2), *T. ovoides* (1) e *T. cutaneum* (2). While until now less widely applied to basidiomycetous fungi, MALDI-TOF appears to be a valuable tool for identifying clinical *Trichosporon* isolates at the species level. The MSP library Biotyper 3.0 showed a poorer performance which was due to misidentified strains utilized as reference for the MSPs.

Descriptors: *Trichosporon* spp, mycosis/diagnosis, molecular typing, proteomics, spectrometry mass matrix-assisted laser desorption-ionisation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e taxonomia do gênero *Trichosporon*

A denominação *Trichosporon* foi utilizada pela primeira vez por Beigel, que em 1865 descreveu o agente de uma infecção benigna do cabelo. A palavra tem origem grega de *trichos* (cabelo) e *sporon* (esporos). Em 1890, o dermatologista alemão Gustav Behend utilizou pela primeira vez a denominação *Trichosporon ovoides* para agente causador de nódulos brancos (*piedra* branca) em barba de um paciente ¹. Em 1902, Vuillemin agrupa as espécies de *Trichosporon* como *T. beigelii*, classificação dada às leveduras que produzem artroconídeos (**Figura 1**) ².

Figura 1. Artroconídeos visualizados em microscopia de contraste de fase (adaptado de: Taj-Aldeen S.J. *et al.*, 2009).

Os fungos leveduriformes do gênero *Trichosporon* pertencem ao Filo *Basidiomycota*, Subfilo *Agaricomycotina*, Classe *Tremellomycetes*, Ordem *Tremellales*, Família *Trichosporonaceae*, e são amplamente distribuídos em regiões de clima tropical e temperado. Podem ser encontrados no solo, em materiais em decomposição, leite e derivados, regiões hipersalinas, excreta de pombos, e em humanos podem constituir flora da pele, das unhas, do trato respiratório, digestivo e trato genital feminino ³⁻⁸.

A nomenclatura *T. beigelii* começou a ser questionada já que isolados ambientais, colonizantes ou relacionados a infecções invasivas, apresentavam características fenotípicas e moleculares diferentes ⁹. Em 1994 Guého *et al.* sugeriram, após detalhado estudo fenotípico e molecular, o abandono da nomenclatura *T. beigelii* e que o gênero continha pelo menos seis espécies responsáveis por infecções em humanos: *T. cutaneum*, *T. asahii*, *T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. asteroides* e *T. inkin* ¹⁰.

Recentes análises da taxonomia do gênero *Trichosporon* através de biologia molecular descrevem 50 espécies, dezessete delas de importância médica: *T. asahii*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. dermatis*, *T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. loubieri*, *T. jirovecii*, *T. montevidense*, *T. mycotoxinovorans*, *T. domesticum*, *T. japonicum*, *T. coremiiforme*, *T. dohaense*, *T. lactis*, *T. faecale*^{11,12}.

1.2 Epidemiologia das infecções invasivas por *Trichosporon* spp.

Nas últimas três décadas, a incidência de infecções fúngicas invasivas (IFI) apresentou aumento significativo devido a diversos fatores: desenvolvimento de técnicas terapêuticas invasivas, utilização em larga escala de antibióticos de amplo espectro, número crescente de transplantes hematológicos e de órgãos sólidos, surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), surgimento de novos e potentes imunossupressores^{13–15}.

Dentre os fungos leveduriformes, *Candida* spp. é certamente o gênero responsável pela maioria destas infecções^{14,16,17}. No entanto, IFI por *Trichosporon* spp. começam a ganhar evidência, principalmente em pacientes onco-hematológicos com cateter venoso central, nos quais a mortalidade pode ser próxima de 100% em casos de neutropenia persistente^{8,18–20}. O primeiro caso de infecção invasiva por *Trichosporon* foi descrito em 1969 em paciente do sexo feminino de 37 anos, com adenocarcinoma pulmonar e metástases cerebrais secundariamente infectadas e, em 2005, Girmenia *et al.* compilaram 287 casos de IFI em pacientes imunodeprimidos^{21,22}.

Rodrigues *et al.* descreveram 22 casos de infecção nosocomial por *Trichosporon asahii* que aconteceram entre agosto de 1999 e junho de 2005 no Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre. Os pacientes tinham entre 6 e 72 anos, e tinham como fatores predisponentes leucemia e granulocitopenia, transplantados de órgão sólido (TOS), câncer de pulmão e neutropenia pós quimioterapia (NPQ), câncer de colo de útero e NPQ, neuroblastoma e NPQ, doença pulmonar obstrutiva crônica, cirrose hepática, insuficiência renal crônica. Dentre as 23 amostras clínicas obtidas de 22 pacientes, 16 foram amostras do trato urinário, 3 hemoculturas, 2 líquidos ascíticos, 1 líquido de diálise e 1 líquido peritoneal. Nove pacientes evoluíram a óbito. As infecções não foram caracterizadas através de critérios técnicos classicamente utilizados, como aqueles estabelecidos pela *National Healthcare Safety Network*^{23,24}.

Chagas-Neto *et al.* estudaram 22 casos de tricosporonemia entre 1995 e 2004 em hospitais da cidade de São Paulo, e encontraram diversas comorbidades, entre elas recém-nascidos de baixo peso, queimados, doença inflamatória gastrointestinal, câncer, pós-operatório de cirurgia abdominal por lesão de arma de fogo, galactosemia, infecção congênita por citomegalovírus e transplante de rim. Os agentes etiológicos mais frequentes foram *T. asahii* (68%) seguido de *T. asteroides*. Oito pacientes evoluíram a óbito (36%) ²⁵.

Ruan *et al.*, ao estudarem os casos de tricosporonemia em Taiwan, observaram que a maioria das infecções (76%) foram causadas pela espécie *T. asahii*, que 95% dos pacientes tinham recebido antibióticos antes da internação, 90% dos pacientes tinham cateter venoso central (CVC) e 58% tinham neoplasia maligna. A mortalidade após 30 dias do diagnóstico da IFI foi de 42% ²⁰.

Em estudo conduzido no hospital M.D. Anderson dos Estados Unidos da América (EUA), Kontonyiannis *et al.* analisaram 17 casos de IFI por *Trichosporon* que ocorreram entre janeiro de 1989 e dezembro de 2002, e calcularam incidência de 3 casos por 100.000 admissões entre pacientes com câncer e 81 por 100.000 admissões entre os pacientes com doença onco-hematológica. A mortalidade calculada após 30 dias do diagnóstico da IFI foi de 53% ⁸.

Em 2005 Abdala *et al.* descreveram o primeiro caso de IFI por *T. asahii* em nossa instituição. A infecção foi diagnosticada em paciente do sexo feminino de 51 anos, que tinha sido submetida a transplante de fígado quatro anos antes, porém não houve confirmação da espécie por técnica molecular ²⁶.

1.3 Diagnóstico

Identificação fenotípica é plausível aos laboratórios de rotina e permite com segurança a caracterização do gênero. Em cultura de meio Sabouraud dextrose (SDA) as colônias desenvolvem-se lisas e leveduriformes nas primeiras 72 horas de incubação, e depois podem adquirir formas cerebriformes, pulverulentas ou algodonosas, a depender da espécie (**Figura 2**) ²⁷.

Figura 2. Colônias de *Trichosporon* em placa de meio SDA à 37°C: após 96 horas, lisas (a), e após 45 dias, cerebriformes (b). (adaptado de: Taj-Aldeen S.J. *et al.*, 2009).

Artroconídios podem ser visualizados em culturas em meio SDA, mas são mais abundantes em microcultivos em lâmina ²⁷. A presença de artroconídios não é característica particular às espécies de *Trichosporon*, podendo ser encontrada também em isolados de *Geotrichum*. Para distinção entre os dois gêneros é necessária a realização da prova da uréase, que é positiva apenas para os fungos basidiomicetos ²⁷. Porém, para caracterização das diferentes espécies de *Trichosporon*, aspectos micromorfológicos e bioquímicos não são suficientes para definição de espécie ¹¹. Os diferentes sistemas de identificação fenotípicos comerciais manuais como API 20C AUX (BioMérieux, França), API 32ID (BioMérieux, França), RapID Yeast Plus system (Innovative Diagnostic System, EUA), ou automatizados como Vitek 2 (BioMérieux, França), Microscan (Baxter, EUA) e Phoenix (BD, EUA) possuem apenas algumas espécies em seus bancos de dados e invariavelmente produzem erros na identificação de espécies ¹¹.

Regiões não estruturais de genes ribossomais, presentes em grande quantidade no genoma de procariontes e eucariontes, são facilmente amplificadas, e seu conteúdo altamente variável entre as espécies pode ser utilizado para identificação de fungos. Estudos recentes compararam a identificação de espécies de *Trichosporon* por sequenciamento de regiões variáveis do DNA ribossomal, como *internal transcriber spacer* entre as regiões 18S e 5.8S (ITS1), D1/D2 da região 26S e *intergenic spacer* entre as regiões 28S e 5S (IGS1) (**Figura 3**) ^{28,29}.

Figura 3. Regiões variáveis do DNA ribossomal para identificação de *Trichosporon*: *internal transcriber spacer* (ITS) e *intergenic spacer* (IGS).

Tais autores encontraram como melhor potencial discriminativo para espécies filogeneticamente próximas de *Trichosporon* a região IGS1, já que os amplicons gerados tinham tamanhos diferentes (600pb a 1000pb), e o número de variações por pares de base foi maior em tal região, hoje considerada a técnica padrão ouro para identificação de espécies^{28,29}.

1.4 Espectrometria de Massa MALDI-TOF

A espectrometria de massa (SM) começou a ser aplicada na identificação de microrganismos nos anos 1970³⁰.

Porém, o grande impulso para desenvolvimento da tecnologia foi dado em 1987 por Tanaka *et al.*, que conseguiram ionizar grandes moléculas por laser ao utilizar uma matriz composta por partículas de cobalto e glicerol³¹. Antes, sem utilização de uma matriz, a ionização de moléculas não voláteis ou de grande peso molecular não era possível. A demonstração da ionização de proteínas através da combinação de feixes de laser de determinado comprimento de onda e de uma matriz conferiu prêmio Nobel de química para Koichi Tanaka em 2002. A matriz foi o componente chave para o avanço da tecnologia. Ela possui quatro utilidades: 1) por ser de natureza ácida, ajuda a romper as células e extrair as proteínas; 2) separa as moléculas de proteínas que são aderidas; 3) absorve a energia do laser e provoca a dessorção das moléculas (extração da placa sólida onde estão aderidas para o estado gasoso); 4) doação de H^+ para as moléculas que passam a ser íons de carga positiva. O termo MALDI é derivado da língua inglesa: *Mass Assisted Laser Desorption/Ionization*, ou seja, dessorção/ionização por laser assistido por matriz. Os equipamentos de SM possuem diversos analisadores que separam os íons de diferentes pesos/massas. Entre tais analisadores/separadores de íons,

há aqueles que diferenciam os pesos/massas pelo tempo de voo destas moléculas em tubo de vácuo (TOF: *time of flight*).

Para a identificação de patógenos por SM MALDI-TOF (MALDI-TOF) são necessárias as seguintes etapas: a primeira consiste em misturar a amostra (ex. colônias de bactérias, fungos) com a matriz. A matriz comumente utilizada para dessorção de proteínas é constituída por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). Posteriormente ocorre evaporação dos solventes e cristalização. O depósito formado pela amostra e pela matriz é realizado sobre uma placa metálica que pode conter diversas divisões que acomoda entre 48 (VITEK MS, BioMérieux, França) e 96 testes (Microflex LT, Bruker Daltonics/BD, Alemanha, EUA) (**Figura 4**).

Figura 4. Após depósito dos analitos na placa metálica (ex. alçada de colônias de bactérias, leveduras), é aplicada a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Nota-se a formação dos cristais formados pela combinação do analito com a matriz (fonte: <https://www.ms-textbook.com>).

A placa metálica por sua vez, é introduzida no espectrômetro de massa e feixes de laser UV de determinado comprimento de onda são emitidos sobre cada depósito. A matriz absorve a energia do laser e ocorre evaporação da amostra com a formação de íons com massas diferentes. Os íons formados com carga +1 são acelerados sob a influência do campo elétrico de carga positiva para dentro de um tubo de voo, no qual em sua extremidade se encontra o detector. Os íons menores chegam mais rapidamente ao detector. O tempo de voo de cada partícula até o detector é utilizado para calcular sua massa. A soma de íons analisados forma o espectro de massa (EM) da amostra analisada. O eixo das abscissas corresponde à relação massa/carga e no eixo das

ordenadas encontram-se a intensidade do sinal, que é proporcional à quantidade de íons de mesma massa ³². Os princípios da tecnologia citada estão ilustrados na **Figura 5** e foram explicitados por Croxatto A. *et al.* em 2011 ³³.

Figura 5. Princípios da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF) (Adaptado de: Croxatto A. *et al.*, 2012).

A principal vantagem da tecnologia de SM MALDI-TOF sobre outras técnicas laboratoriais para identificação de microrganismos é a agilidade para obtenção dos resultados. Entre a confecção do depósito e a leitura final, um resultado isolado pode ser obtido em menos de trinta minutos ³³.

Dois instrumentos SM MALDI-TOF são/estarão disponíveis no mercado nacional para uso em laboratórios clínicos: Microflex LT® (Bruker Daltonics/BD, Alemanha/EUA) e VITEK MS® (BioMérieux, França) (**Figura 6**).

Figura 6. Plataformas de espectrometria de massa MALDI-TOF disponíveis no mercado nacional: A) VITEK MS (BioMérieux, França); B) Microflex LT® (Bruker Daltonics/BD, Alemanha/EUA).

Os EMs são obtidos e processados por softwares específicos, Flexanalysis® (Bruker Daltonics/BD, Alemanha/EUA) ou Myla® (BioMérieux, França), e posteriormente são comparados ao banco de dados que contém espectros de referência (ER) ou “super espectros” para a identificação de espécie.

O banco de dados mais recente da Bruker Daltonics/BD (Alemanha/EUA) é o Biotyper 3.2.1.0®, que contém 82000 ERs que contemplam cerca de 2000 espécies de bactérias e leveduras. O instrumento VITEK MS (BioMérieux, França) compara o EM com o banco de dados *Spectral Archive and Microbial Identification System* (SARAMIS, BioMérieux, França). O database SARAMIS (versão 4.0) contém cerca de 3000 “super espectros” de 2000 espécies de bactérias e leveduras.

O software Biotyper (Bruker Daltonics/BD, Alemanha/EUA) utiliza até 100 picos de qualidade (excedem uma relação sinal/ruído pré-definida) entre 3000 e 15000D para criar um EM o qual é comparado aos ERs, levando em consideração o número de picos e suas intensidades compatíveis para calcular valores que são expressos em *logscore* (LS) entre 0 e 3. Valores de LS inferiores a 1.7 são considerados insuficientes para identificação de gênero, entre 1.7-2.0 são classificados como suficientes para identificação de gênero e, se superior à 2.0, a identificação de espécie é assegurada. Já o software SARAMIS utiliza picos comuns de cepas de mesma espécie (entre 15-20) para construir um “super espectro”. Quando um EM de uma amostra é comparado a um “super espectro”, valores superiores a 60% significam identificação de espécie. Os resultados produzidos pelo VITEK MS são divididos em categorias como “good

identification (ID)”, quando o EM criado encontra perfeita correlação (99,9% valor de probabilidade, valor de confiança), discriminação baixa ou *low discrimination* (>60%-99,8% de probabilidade, valor de confiança) ou “no ID” (<60% de probabilidade, valor de confiança).

O software Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics/BD, Alemanha/EUA) que foi utilizado neste trabalho contém 12 espectros de referência do gênero *Trichosporon*: 2 *Trichosporon* sp., 2 *T. asahii*, 2 *T. cutaneum*, 2 *T. inkin*, 2 *T. mucoides*, 1 *T. ovoides* e 1 *T. deubammanium*. Este último ainda não foi citado como responsável por infecções em humanos ¹¹.

A SM por MALDI-TOF tem sido estudada para identificação de fungos leveduriformes, alguns deles com inclusão de poucos isolados de *Trichosporon*. Os principais estudos estão apontados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Estudos que utilizaram espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de *Trichosporon* spp.

Autor	Ano	País	Espécies/número	Aparelho	Id (%)
Marklein G <i>et al</i> ³⁴ .	2009	Alemanha	<i>T. cutaneum</i> /3	Bruker Microflex	0-100*
Stevenson LG <i>et al</i> ³⁵ .	2010	Estados Unidos da América	<i>T. asahii</i> /4 <i>T. coremiiforme</i> /1 <i>T. mucoides</i> /3	Bruker Microflex	0-100*
Bader O <i>et al</i> ³⁶ .	2011	Alemanha	<i>T. asahii</i> /4	Anagnostec Saramis Bruker Microflex	100
Van Herendaël <i>et al</i> ³⁷ .	2012	Bélgica	<i>T. asahii</i> /1	Bruker Microflex	100
Cassagne C <i>et al</i> ³⁸ .	2012	França	<i>T. inkin</i> /1	Bruker Microflex	100
Sendid B <i>et al</i> ³⁹ .	2013	França	<i>Trichosporon</i> sp./2 <i>T. inkin</i> /1 <i>T. mucoides</i> /1	Bruker Microflex	50

Id= identificação * = após inclusão de ER no banco de dados original

Alguns destes estudos demonstraram que a identificação só foi possível após inclusão de ERs ao banco de dados Biotyper 3.0 ^{34,35}.

2. JUSTIFICATIVA

O complexo HC-FMUSP é um hospital público, universitário e de nível quaternário, que engloba: Instituto do Coração (INCOR), Instituto da Criança (ICr), Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT), Instituto de Psiquiatria (IPQ), Instituto Central (IHC), Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), e Prédio dos Ambulatórios (PAMB) onde se localizam os ambulatórios de diferentes especialidades e hospital-dia. Como o serviço de Microbiologia atende a todos os hospitais do complexo, a demanda é caracterizada por uma grande diversidade de amostras e, consequentemente, de patógenos isolados, exigindo constante treinamento e atualização dos microbiologistas clínicos, para que os resultados sejam de qualidade e impactem positivamente no diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas.

A análise de grande contingente de isolados clínicos de *Trichosporon*, com identificação das espécies pela técnica molecular padrão-ouro, e posterior padronização de especiação por SM MALDI-TOF, é inédita na instituição e no país.

A utilização da tecnologia MALDI-TOF em parceria com um laboratório de micologia francês (*Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, l'Hopital Saint-Antoine, APHP, INSERM/UPMC UMRs 945*) para a identificação das cepas de *Trichosporon*, servirá de base para a implementação da tecnologia no Setor de Micologia do Serviço de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central (DLC) do complexo HC-FMUSP.

A tecnologia de EM MALDI-TOF é considerada grande avanço para a Microbiologia, e atualmente é bastante explorada pela comunidade científica para identificação de espécies que antes só eram identificadas por biologia molecular. A identificação de fungos pela técnica ainda é pouco explorada, sendo que a padronização da identificação de espécies de *Trichosporon* de importância médica permitirá o correto mapeamento deste patógeno emergente em nossa instituição, sem a necessidade de utilização de técnicas moleculares laboriosas e de alto custo.

3. OBJETIVOS

Identificar espécies de cepas/isolados de *Trichosporon* de pacientes do HC-FMUSP, de outros hospitais do Estado de São Paulo e de diferentes hospitais franceses através de biologia molecular, e posteriormente padronizar a especiação por espectrometria de massa MALDI-TOF.

Analisar a acurácia da técnica de EM MALDI-TOF frente às técnicas moleculares para identificação de espécies de *Trichosporon*.

4. ARTIGOS

ORIGINAL ARTICLE

10.1111/1469-0691.12502

Usefulness of matrix-assisted laser desorption ionisation–time-of-flight mass spectrometry for identifying clinical *Trichosporon* isolatesJ. N. de Almeida Júnior^{1,2,3}, D. S. Y. Figueiredo³, D. Toubas^{4,5}, G. M. B. Del Negro³, A. L. Motta¹, F. Rossi¹, J. Guitard^{2,6,7}, F. Morio⁸, E. Bailly⁹, A. Angoulvant¹⁰, D. Mazier^{2,6}, G. Benard³ and C. Hennequin^{2,6,7}

1) Central Laboratory Division-LIM03, Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, Brazil, 2) INSERM, U945, Paris, France, 3) Mycology Laboratory-LIM-53, Instituto de Medicina Tropical, FMUSP, São Paulo, Brazil, 4) Mycology-Parasitology Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, 5) Unité MEDyC, FRE CNRS 3481 Université de Reims Champagne-Ardenne, SFR Cap Santé, Faculté de Médecine, Reims, 6) Université Pierre et Marie Curie Paris6, UMR S945, 7) Mycology-Parasitology Laboratory, AP-HP, Hôpital St Antoine, Paris, 8) Mycology-Parasitology Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, 9) Mycology-Parasitology Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, Tours and 10) Mycology-Parasitology Laboratory, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

Abstract

Trichosporon spp. have recently emerged as significant human pathogens. Identification of these species is important, both for epidemiological purposes and for therapeutic management, but conventional identification based on biochemical traits is hindered by the lack of updates to the species databases provided by the different commercial systems. In this study, 93 strains, or isolates, belonging to 16 *Trichosporon* species were subjected to both molecular identification using IGS1 gene sequencing and matrix-assisted laser desorption ionisation–time-of-flight (MALDI–TOF) analysis. Our results confirmed the limits of biochemical systems for identifying *Trichosporon* species, because only 27 (36%) of the isolates were correctly identified using them. Different protein extraction procedures were evaluated, revealing that incubation for 30 min with 70% formic acid yields the spectra with the highest scores. Among the six different reference spectra databases that were tested, a specific one composed of 18 reference strains plus seven clinical isolates allowed the correct identification of 67 of the 68 clinical isolates (98.5%). Although until recently it has been less widely applied to the basidiomycetous fungi, MALDI–TOF appears to be a valuable tool for identifying clinical *Trichosporon* isolates at the species level.

Keywords: Identification, main spectrum database, MALDI–TOF mass spectrometry, protein extraction procedures, *Trichosporon*

Original Submission: 17 July 2013; **Revised Submission:** 12 November 2013; **Accepted:** 10 December 2013

Editor: R. Piarroux

Article published online: 13 December 2013

Clin Microbiol Infect

Corresponding author: J. N. de Almeida Júnior, Laboratório de Microbiologia, DLC, PAMB, Instituto Central. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - Cerqueira César - 05403-000/São Paulo, Brazil
E-mail: jnaj99@gmail.com

Introduction

Trichosporon spp. are well recognized as causative agents of white piedra, a benign cutaneous infection characterized by the presence of irregular nodules in hairy regions [1]. However, more recently, the *Trichosporon* genus has emerged as a

life-threatening opportunistic pathogen responsible for invasive infections in immunosuppressed patients [2–5]. Disseminated infection is their most common clinical picture [6,7]. Their reported mortality rates range between 50% and 80%, eventually reaching 100% in onco-haematological patients with persistent neutropenia [2,3,8].

To date, at least 17 different species have been considered as aetiological agents of *Trichosporon* infections [8–10]. Species identification is important for epidemiological purposes and to better define species-specific clinical associations [11,12]. In addition, certain *Trichosporon* species may be more resistant to antifungal drugs [8]. However, identifying *Trichosporon* species may be difficult because the databases based on commercial biochemical systems lack some of the newly described species.

Even the target to use for molecular identification is the subject of debate. Indeed, analysis of the ITS1 region and the D1/D2 domain of the large subunit of rDNA can fail in the identification of *Trichosporon* species, because these sequences may only represent 1% of the nucleotide divergence of closely related species [13–15]. However, Sugita *et al.* [14] have shown that IGS1 sequencing allows closely related species to be distinguished and should be considered as the method of choice for accurately identifying *Trichosporon* species.

Matrix-assisted laser desorption ionisation–time-of-flight (MALDI–TOF) mass spectrometry (MS) has recently emerged as a powerful tool for identifying yeast species and some of the species of filamentous fungi from the Ascomycota phylum [16–18]. To the best of our knowledge, a single study has focused on *Trichosporon* identification using MS [19]. This study, however, included IGS1 sequencing analysis for only a limited number of strains [19].

In the present study, we used a large panel of well-characterized strains and clinical isolates belonging to the main pathogenic *Trichosporon* species to evaluate the performance of MALDI–TOF for identifying clinical *Trichosporon* isolates.

Materials and Methods

Strains

Ninety-three *Trichosporon* strains were included (Table 1). Nineteen of these were reference strains from the CBS collection (<http://www.cbs.knaw.nl/collections/Biolomics.aspx?Table=Yeast%202011>). Seventy-four were clinical isolates collected between 2004 and 2012, which were recovered from different body sites (blood, urine, stools, skin and respiratory tract) and maintained as frozen stocks at -80°C in yeast-extract peptone dextrose medium. They belong to the collections of large university hospitals in São Paulo, Brazil, and Paris, Tours, Reims, Bordeaux and Nantes in France. Their initial identification was based on their phenotypic traits (arthrospores and positive urea test) and biochemical profile (obtained using either the 20AUX/ID32C panels or the VITEK2 automated system) (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) and/or the sequences of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region or intergenic spacer 1 region of their rDNA (IGS1) [14,20].

Matrix-assisted laser desorption ionisation–time-of-flight mass spectrometry identification

Mass spectra were acquired using a Microflex LT MALDI–TOF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). The post-analytical procedures were conducted using Biotyper software and its associated database version 3.0 (Bruker). Identification

TABLE 1. Strains utilized in this study according to species, phenotypic and genotypic identification, country and strain name.

Strain name	Country	Phenotypic identification	Molecular identification	MS identification
DLC4	Brazil	<i>Trichosporon ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
DLC7 ^g	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
DLC9	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
DLC12	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
DLC14	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
IAL2	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
IAL5	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
IAL6	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
IAL7	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
IAL11	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
IAL12	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
F2201	France	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
FT01	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
FT02	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
RHD01	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
RKBC101	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
PSA02	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
RNA01	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
RNA02	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
RNA03	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
RNA04	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
RNA05	France	<i>T. ashi</i> ^a	ND	<i>T. ashi</i>
CBS8972 ^g	Israel	NA	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
CBS7631 ^g	France	NA	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
CBS2479	Japan	NA	<i>T. ashi</i> ^f	<i>T. ashi</i>
DLC2	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>Trichosporon inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
DLC3	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
DLC6	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
DLC11 ^g	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
DLC15	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
DLC16	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
F0302	France	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
F2501	France	<i>T. inkin</i> ^b	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
FI001	France	<i>T. inkin</i> ^b	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
FR03	France	<i>T. inkin</i> ^c	ND	<i>T. inkin</i>
FR05	France	<i>T. inkin</i> ^c	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
FR13	France	<i>Trichosporon sp.</i> ^e	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
RNA06	France	<i>T. inkin</i> ^c	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
RNA07	France	<i>T. inkin</i> ^c	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
CBS7630 ^g	United Kingdom	NA	<i>T. inkin</i> ^f	<i>T. inkin</i>
DLC10	Brazil	<i>Trichosporon mucoides</i> ^a	<i>Trichosporon dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
F2101	France	<i>T. mucoides</i> ^a	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FI601	France	<i>T. mucoides</i> ^a	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
F2401	France	<i>T. mucoides</i> ^a	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
F2301	France	<i>T. mucoides</i> ^a	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FI801	France	<i>T. mucoides</i> ^a	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FI301	France	<i>T. mucoides</i> ^a	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
F0801 ^g	France	<i>T. mucoides</i> ^a	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FI401	France	<i>T. mucoides</i> ^a	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
F2801	France	<i>T. mucoides</i> ^a	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR02	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR04	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR06	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR11	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR14	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR15	France	<i>Trichosporon sp.</i> ^e	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR16	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR21	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR23	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR25	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FR26	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FT03	France	<i>T. mucoides</i> ^b	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
CBS10495 ^g	Argentina	NA	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
CBS2043 ^g	Germany	NA	<i>T. dermatis</i> ^f	<i>T. dermatis</i>
FI901	France	<i>T. ashi</i> ^a	<i>Trichosporon faecale</i> ^f	<i>T. faecale</i>
PSA03	France	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. faecale</i> ^f	<i>T. faecale</i>
IAL03 ^g	Brazil	<i>T. ashi</i> ^a	<i>T. faecale</i> ^f	<i>T. faecale</i>
IAL04	Brazil	<i>T. inkin</i> ^a	<i>T. faecale</i> ^f	<i>T. faecale</i>
CBS4828 ^g	Brazil	NA	<i>T. faecale</i> ^f	<i>T. faecale</i>
F2701 ^g	France	<i>Trichosporon sp.</i> ^e	<i>Trichosporon jirovecii</i> ^f	<i>T. jirovecii</i>
F2702	France	<i>Trichosporon sp.</i> ^e	<i>T. jirovecii</i> ^f	<i>T. jirovecii</i>

Table 1 (Continued)

Strain name	Country	Phenotypic identification	Molecular identification	MS identification
F2601	France	<i>Trichosporon</i> sp. ^a	<i>T. jirovecii</i> ^f	<i>T. jirovecii</i>
PSA01	France	<i>Trichosporon</i> sp. ^a	<i>T. jirovecii</i> ^f	<i>T. jirovecii</i>
CBS6864 ^g	Czech Republic	NA	<i>T. jirovecii</i> ^f	<i>T. jirovecii</i>
F0501 ^h	France	<i>T. inkin</i> ^a	<i>Trichosporon montevidense</i> ^f	<i>T. montevidense</i>
F0701	France	<i>T. inkin</i> ^a	<i>T. montevidense</i> ^f	<i>T. montevidense</i>
FR01	France	<i>T. asahii</i> ^c	ND	<i>T. montevidense</i>
CBS8605 ^g	Netherlands	NA	<i>T. montevidense</i> ^f	<i>T. montevidense</i>
FR29 ^h	France	<i>T. asahii</i> ^c	<i>Trichosporon coremiforme</i> ^f	<i>T. coremiforme</i>
FR31	France	<i>Trichosporon</i> sp. ^a	ND	<i>T. coremiforme</i>
CBS2482 ^g	Costa Rica	NA	<i>T. coremiforme</i> ^f	<i>T. coremiforme</i>
FR12	France	<i>T. mucoides</i> ^c	<i>T. mucoides</i> ^f	<i>T. mucoides</i>
CBS7625 ^g	Belgium	NA	<i>T. mucoides</i> ^f	<i>T. mucoides</i>
FR07	France	<i>T. inkin</i> ^c	ND	<i>Trichosporon lactis</i>
CBS9051 ^h	Austria	NA	<i>T. lactis</i> ^f	<i>T. lactis</i>
FBOR01	France	<i>Trichosporon</i> sp. ^a	<i>Trichosporon loubieri</i> ^f	<i>T. loubieri</i>
CBS7719 ^g	Australia	NA	<i>T. loubieri</i> ^f	<i>T. loubieri</i>
CBS7556 ^g	Italy	NA	<i>Trichosporon ovoides</i> ^f	<i>T. ovoides</i>
CBS2466 ^g	France	NA	<i>Trichosporon cutaneum</i> ^f	<i>T. cutaneum</i>
CBS8280 ^g	Japan	NA	<i>Trichosporon domesticum</i> ^f	<i>T. domesticum</i>
CBS8641 ^h	Japan	NA	<i>Trichosporon japonicum</i> ^f	<i>T. japonicum</i>
CBS9756 ^g	Germany	NA	<i>Trichosporon mycotoxinovans</i> ^f	<i>T. mycotoxinovans</i>
CBS2481 ^h	Switzerland	NA	<i>Trichosporon asteroides</i> ^f	<i>T. asteroides</i>

^aIdentification using the VITEK2 system (Biomérieux, Marnes-la-Coquette, France).

^hIdentification using the API 20 ALUX system (Biomérieux).

ⁱIdentification using the API 32 ID system (Biomérieux).

^cIdentification based on arthrospores and positive urease test.

^fIdentification using ITS1 rDNA sequencing.

^gIdentification using IGS1 rDNA sequencing.

^gStrains included in main spectrum databases.

compatibility relies upon comparing a given spectrum against a main spectra (MSP) database, and its value is expressed as a logscore (LS). LS values vary between 0 and 3, with 0 indicating no relationship and 3 indicating identical spectrum profiles. According to the manufacturer's recommendations, LS values between 1.7 and 2 are acceptable for genus identification, and an LS value ≥ 2.0 is required for accurate species identification.

Protein extraction protocols

Because the spectra that were generated using intact cells exhibited only a limited number of peaks (data not shown), we first compared three different protein extraction protocols to determine which led to spectra with the highest logscores. The isolates were slant-subcultured on Sabouraud dextrose agar containing chloramphenicol and gentamicin (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) for 48 h at 30°C. All three of the tested protocols relied on the extraction efficacy of ethanol 70% and formic acid 70% (FA) plus acetonitrile 100% (ACN) for the colonies harvested from the slant cultures. The first protocol followed the manufacturer's recommendations for yeast identification. The second and third protocols were

recently published by Cassagne et al. [16] and Sendid et al. [21], respectively. They differed in the time of the initial centrifugation, the time of incubation, the volumes of FA and ACN that were used and the volume of the final deposit on the slide (Table S1).

To compare the performances of the protocols, three MSP libraries (one for each extraction procedure) were built. Each library contained five MSPs, one for each of the following strains: *Trichosporon dermatitis* F0801, *Trichosporon montevidense* CBS8605, *Trichosporon inkin* CBS7630, *T. dermatitis* CBS2043 and *Trichosporon asahii* CBS8972. Each MSP was created from 20 spectra that were obtained from four slant cultures (five extractions per culture) using Biotyper software 3.0 with the MSP standard method parameters. Each of the 20 raw spectra composing an MSP was submitted for MS identification and the best-matched LS values were calculated, generating 100 LS values per extraction protocol, which were then compared.

Comparison of different databases for identifying

Trichosporon isolates

The BioTyper vs. 3.0 database (database 1) contains 11 MSPs, which represent six different species. To enlarge this spectrum of species, we created MSPs for 18 CBS reference strains and seven clinical isolates of 16 species that had been identified through the sequences of the IGS1 region (Table S2). Five additional databases encompassing the MSPs of the reference strains (database 2), combinations of databases 1 and 2, and the MSPs of the clinical isolates were evaluated for the identification of the remaining 68 strains.

Protein extracts of the 68 strains that were not included in the MSP database were tested in quadruplicate. For qualitative analysis (i.e. correct or incorrect identification at the genus and species levels) only the spot returning the highest LS was considered. For the 51 strains for which IGS1 rDNA region was sequenced, the spectrometric identification was considered correct if the results of both methods were congruent. For the remaining 17 strains, the spectrometric identification was considered correct if the BioTyper analysis returned an LS of greater than 2 for only one species.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using Prism software, version 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The LSs obtained using each extraction protocol were compared using the non-parametric rank sum Kruskal-Wallis test. In the case of a significant difference, a *post-hoc* analysis was conducted using pairwise matched Dunn's tests with adjustment for multiple comparisons. In every case, two-sided tests were utilized and a *p* value of <0.05 was considered significant.

Results

Performance of biochemical-based identification

Phenotypic identification led to a high number of mis- or non-identifications (Table 1). All isolates of *T. dermatis* were misidentified as *T. mucoides*. In addition, half (seven of 14) of the *T. inkin* isolates were misidentified as *T. asahii*. Misidentification as *T. asahii* or *T. inkin* was also noted for *Trichosporon faecale* ($n = 4$), *T. montevidense* ($n = 3$), *Trichosporon coremiforme* ($n = 1$) and *Trichosporon lactis* ($n = 1$). Finally, all of the *Trichosporon jirovecii* isolates ($n = 4$) were not identified at the species level but had only a genus characterization.

Protein extraction protocol

Three different protein extraction protocols were compared for their ability to generate high LSs (Fig. 1). A significant difference in the performance of these protocols ($p = 0.014$) was observed. A *post hoc* analysis revealed that protocol 3 performed better than protocol 1 ($p = 0.012$) but not protocol 2 ($p = 0.86$) and that protocol 1 and protocol 2 performed similarly ($p = 0.2$). Because protocol 3 provided more homogeneous results than the other methods, it was selected for further experiments.

Comparison of the main spectra databases for species identification

The performances of the six databases that were tested for *Trichosporon* species identification are summarized in Fig. 2. The Biotyper 3.0 database (database 1) returned the lowest level of correct identification at the genus (85.1%) and the species (31.3%) levels. In contrast, 100% identification at the

FIG. 1. Box-and-whiskers plot of the logscore values obtained using the three extraction procedures tested in this study. Protocol 1: Bruker's recommended protocol for yeast identification. Protocol 2: described by Cassagne *et al.* [16]. Protocol 3: described by Sendid *et al.* [21]. * Statistically significant difference ($p = 0.012$).

FIG. 2. Distribution of the logscore (LS) values for 68 strains obtained using matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight (MALDI-TOF), according to the reference main spectra (MSP) databases that were searched. The dark line represents the best-matched LS values of the correct identification results, whereas the grey line shows the best-matched LS values of the misidentification results. (a) Biotyper 3.0, database 1: several incorrect identifications with LS values below 1.6 (mainly related to the absence of the species in the main spectra (MSP) database) and with LS values above 2.0 (MSPs with incorrect identification); (b) CBS strains, database 2; (c) Biotyper 3.0 and CBS strains, database 3; (d) Biotyper 3.0 and clinical strains, database 4; (e) CBS and clinical strains, database 5; (f) Biotyper 3.0, CBS and clinical strains, database 6. Databases 5 and 6 yielded the best results, but incorrect identifications of *Trichosporon dermatis* as *Trichosporon mucoides* with LS values above 2.0 were noted for one and three isolates, respectively.

genus level and 98.5% identification at species level were achieved using database 5, which contained 25 MSPs of clinical and CBS strains. The rate of identification with an LS of >2.0 ranged from 28.36% (database 1) to 91.04% (database 5).

Analysis using the BioTyper 3.0 database revealed misidentifications (LS >1.7) for isolates of six species that are not represented in the database (Table 2). This was particularly the case for *T. dermatis* isolates ($n = 21$). In addition, ten *T. asahii* isolates were identified as *T. cutaneum*. To dissect these discrepancies, cross-identification of the MSPs in the Biotyper 3.0 database with those derived for the CBS strains and the clinical isolates showed that *T. cutaneum* BioTyper MSP(s) were identified as that/those of *T. asahii*, whereas the *Trichosporon ovoides* BioTyper MSP was recognized as that of

TABLE 2. Discordant results with logscore values above 1.7 that were obtained using databases 1 and 2

Database	Spectrometric identification (number)	Logscore range	Molecular identification*	MPS present in the database (number)
Database 1 (Biotype 3.0)	<i>Trichosporon mucoides</i> (n = 19)	1.709–2.477	<i>Trichosporon dermatis</i>	No
	<i>Trichosporon ovoides</i> (n = 2)	2.04–2.014	<i>T. dermatis</i>	No
	<i>Trichosporon cutaneum</i> (n = 10)	2.146–2.338	<i>Trichosporon asahii</i>	Yes (2)
	<i>T. mucoides</i> (n = 1)	1.864	<i>Trichosporon jirovecii</i>	No
Database 2 (CBS strains)	<i>T. mucoides</i> (n = 6) ^b	2.36–2.467	<i>T. dermatis</i>	Yes (2)
	<i>T. ovoides</i> (n = 1)	1.754	<i>Trichosporon inkin</i>	Yes (1)

*As identified using IGS1 sequencing.

^bOne of these strains (FR16) was later identified as *Trichosporon mucoides* using a multilocus approach (Congress of the French Society of Medical Mycology, Dijon, 16–17 May 2013, abstract 15).

T. dermatis. Similarly, the database composed using CBS strains only (database 2) misidentified seven isolates of *T. dermatis* as *T. mucoides* and one *T. inkin* isolate as *T. ovoides*.

Interestingly, misidentifications resulting from using database 2 led us to sequence the IGS1 region of the strain CBS10495, originally described as *T. mucoides* but found to be *T. dermatis* after final identification (GenBank accession number AB066412.1). Finally, one isolate (FR16) that was identified as *T. mucoides* using the MALDI-TOF results to search database 5 (LS = 2.549) had 99% identity with *T. dermatis* according to its IGS1 rDNA sequences (GenBank accession number JF302985.1). However, using a multilocus phylogenetic approach, the strain was found to be closely related to *T. mucoides* (Congress of the French Society of Medical Mycology, Dijon, 16–17 May 2013, abstract 15).

Discussion

Trichosporon spp. have recently emerged as life-threatening opportunistic pathogens [8]. Species identification in this genus that would allow the description of possible new epidemiological traits and would facilitate the difficult decision-making regarding an antifungal strategy has become a challenging issue. Biochemical profiling methods appear clearly insufficient for the reliable identification of *Trichosporon* species, even if, due to the heterogeneous phenotypic methods utilized for the initial characterization, a one to one comparison with the molecular or proteomic identification was not possible. In contrast, MALDI-TOF MS has emerged as a powerful and reliable tool for the identification of fungi [22,23]. Some of these studies included a small number of *Trichosporon* isolates [21,22,24–27]. For example, Stevenson et al. [24] included nine species for an in-house database construction, but did not include *T. dermatis*, for which the distinction from *T. mucoides* is the most challenging. More recently, Kolečka et al. [19] studied a large collection of arthroconidial yeasts, including *Trichosporon* spp., using MALDI-TOF MS. The overall rate of accurate species identification ranged from 95% (CBS strain collection) to

97% (clinical isolates). As in our study, discrepancies were demonstrated for some of the clinically relevant, closely related species, such as *T. inkin/T. ovoides* and *T. mucoides/T. dermatis*. The frequency of these discrepancies may have been underestimated in that study because (i) only *T. asahii* strains were subjected to IGS1 sequencing and (ii) only a limited number of *T. mucoides/T. dermatis* strains were tested; this distinction appeared in our experience to be the most challenging issue [19]. Thus, a robust database including well-identified *Trichosporon* isolates (IGS1 rDNA sequenced) representing the majority of species that are related to human infections is required to identify the entire spectrum of *Trichosporon* infections.

Although direct deposit of intact cells on the target plate is the simplest method of sample processing, several authors have stated that protein extraction provided better results [21,26,27]. Similarly, the 'smear procedure' described by the manufacturer was not achievable, because some of the isolates produced colonies that were difficult to homogeneously spot onto the plate. In contrast, the extraction protocols previously described [16,21] were shown to be powerful adjuncts for MALDI-TOF analysis of *Trichosporon* species, allowing reliable and reproducible results to be achieved. We believe that the longer exposure to formic acid (30 min) was responsible for the better results obtained using protocol 3, compared with protocol 1. However, in routine practice, the additional incubation period is time consuming, and protocol 2 may be preferred.

Moreover, the reliability of the identification was obviously dependent on the MSP library that was used. The results presented here showed that the manufacturer's MSP library is insufficient to identify several of the *Trichosporon* species of medical importance. This finding reflects this database's lack of MSPs for some of the common species, such as *T. dermatis*, and the inclusion of MSPs for strains with probable erroneous identification. The former case has already been described because some unusual species could be identified only after the original MSP library was upgraded [28,29]. The latter situation led to the misidentification of 52.4% (11 out of 21) of the *T. asahii* strains as *T. cutaneum* when the Bruker

database was used. We are not aware of any molecular data concerning the two strains (120PSB and 95PSB) that were used to generate the Biotyper MSP that is representative of *T. cutaneum*. Stevenson *et al.* [24] also described the erroneous identification of several of the *Trichosporon* reference strains. This was also the case for the CBS 10495 strain, described as *T. mucoides* based on ITS and D1/D2 regions sequencing but identified in this study as *T. dermatis* based on IGS1 sequencing, in accordance with the MS identification.

Considering these different features, we were able to build a specific database that allowed a 98.5% correct identification rate at the species level. The library contained 25 MSPs from either the CBS strains or the clinical isolates that had a definitive molecular-based identification (IGS1 sequencing), representing 16 different species. The recommendation that each species should be represented by several isolates was followed [16,24]. Interestingly, whereas misidentifications of *T. dermatis* as *T. mucoides* using phenotypical or molecular methods have been reported [11,12,15], our optimized database unambiguously identified 21 isolates from both of these species. Moreover, the single discrepancy found in this study between IGS1 sequencing-based analysis, which provided a 99% identity of the isolate as *T. dermatis*, and MALDI-TOF MS-based analysis, which identified it as *T. mucoides*, referred to an isolate that was related to *T. mucoides* using a multilocus analysis. More strains of *T. mucoides* need to be studied to confirm this observation.

Using this database, we found that, consistent with previous studies, *T. asahii* was the species that was most frequently isolated from clinical specimens [12,30]. There are increasing data supporting the existence of *T. asahii* isolates with high minimal inhibitory concentrations for azole derivatives [8], which are frequently used as the first-line therapy, reinforcing the need for methods that provide rapid and accurate identification of *Trichosporon* isolates. Thus, in addition to the epidemiological importance of correct species identification, rapid and reliable identification of *T. asahii* certainly will facilitate the choice of an optimal antifungal therapy. Identification of fungal pathogens is essential, and our results illustrate its importance in epidemiology and the prescription of the appropriate antifungal therapy and possibly in taxonomic studies. Revisiting the fungal epidemiological findings using reliable identification techniques is crucial to reveal the pathogenic potential of species not currently considered problematic and, conversely, to rule out some of the species that were formerly considered pathogenic. MALDI-TOF MS appears to be particularly suitable for investigating the *Trichosporon* genus, but the Biotyper 3.0 database requires improvement.

Acknowledgements

We are indebted to M. Melhem for kindly providing us with strains and to S. Vellaissamy for excellent technical assistance.

Financial Support

JNAJ was supported by grants from FAPESP (2011/08911-0) and CAPES (0324-12-4) and has benefitted from a travel grant from the ECCMID. A grant from Pfizer was awarded to CH for this study.

Author Contributions

All authors have seen and approved the manuscript and they contributed significantly to the work. Study design: DSYF, GMBDN, JG, DM, GB and CH. Acquisition of data: JNAJ, DSYF, DT, AL, FM, EB, AA and CH. Analysis and interpretation of data: JNAJ, GMBDN, DM and CH. Article construction: JNAJ, DSYF, DT, GMBDN, AL, FM, EB, AA, DM and CH. Final review of the version to be published: JNAJ, GB and CH.

Transparency Declaration

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Summary of the different protein extraction protocols used in this study

Table S2. Composition (number of representative species and code of the strains) of the reference spectra databases used in this study.

References

1. Hautier-Mazereeuw J, Linas MD, Clavier F, Bonafe JL. [White piedra]. *Ann Dermatol Venerol* 1999; 126: 839–840.
2. Girmenia C, Pagano L, Martino B *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* 2005; 43: 1818–1828.

3. Suzuki K, Nakase K, Kyo T et al. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Eur J Haematol* 2010; 84: 441–447.
4. Chitasombat MN, Kofleridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J Infect* 2012; 64: 68–75.
5. Kontoyiannis DP, Torres HA, Chagua M et al. *Trichosporon*osis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 564–569.
6. Mirza SH. Disseminated *Trichosporon beigelii* infection causing skin lesions in a renal transplant patient. *J Infect* 1993; 27: 67–70.
7. Tashiro T, Nagai H, Nagaoka H, Goto Y, Kamberi P, Nasu M. *Trichosporon beigelii* pneumonia in patients with hematologic malignancies. *Chest* 1995; 108: 190–195.
8. Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporon*osis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 682–700.
9. Taj-Aldeen SJ, Al-Ansari N, El Shafei S et al. Molecular identification and susceptibility of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Qatar: isolation of *Trichosporon dohaense* Taj-Aldeen, Meis & Boekhout sp. nov. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1791–1799.
10. Hickey PW, Sutton DA, Fothergill AW et al. *Trichosporon mycotoxinivorus*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3091–3097.
11. Gunn SR, Reveles XT, Hamlington JD, Sadkowski LC, Johnson-Pais TL, Jorgensen JH. Use of DNA sequencing analysis to confirm fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a pediatric patient. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1175–1177.
12. Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo ASA, Colombo AL. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1074–1081.
13. Guého E, Improvisi L, de Hoog GS, Dupont B. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses* 1994; 37: 3–10.
14. Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1826–1830.
15. Guo L-N, Xiao M, Kong F et al. Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3805–3811.
16. Cassagne C, Ranque S, Normand A-C et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 2011; 6: e28425.
17. Murray PR. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14: 419–423.
18. Kok J, Chen SCA, Dwyer DE, Iredell JR. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Pathology* 2013; 45: 4–17.
19. Kolečka A, Khayhan K, Groenewald M et al. MALDI-TOF MS identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2491–2500.
20. Diaz MR, Fell JW. High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *trichosporon*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3696–3706.
21. Sendid B, Ducoroy P, François N et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. *Med Mycol* 2013; 51: 25–32.
22. Marklein G, Josten M, Klanke U et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2912–2917.
23. Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 634–642.
24. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3482–3486.
25. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1359–1365.
26. Van Herendaal BH, Bruynseels P, Bensaid M et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 841–848.
27. Cassagne C, Cella A-L, Suchon P, Normand A-C, Ranque S, Piarroux R. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med Mycol* 2013; 51: 371–377.
28. Murugaiyan J, Ahrholdt J, Kowbel V, Roesler U. Establishment of a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 461–467.
29. Verroken A, Janssens M, Berhin C et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nocardia species. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4015–4021.
30. Rodríguez-Tudela JL, Díaz-Guerra TM, Mellado E et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4026–4034.

Supporting information

Table S1: Summary of the different protein extraction protocols used in this study

	Protocol 1	Protocol 2	Protocol 3
Step 1	Colonies harvested in HPLC-grade sterile water and 900 μ L of anhydrous ethyl alcohol		
Centrifugation	2 min	10 min	3 min
13.000 rpm			
Step 2	50 μ L of 70% FA plus 50 μ L of 100% ACN	10 μ L of 70% FA	50 μ L of 70% FA
Incubation	None	5 min	30 min
Step 3	None	10 μ L of 100% ACN	50 μ L of 100% ACN
Incubation	None	5 min	none
Deposit	1.2 μ l	1 μ l	1.5 μ l
FA: formic acid; ACN: acetonitrile			

Table S2: Composition (number of representative species and code of the strains) of the reference spectra databases used in this study. Database 1 represents Biotyper MSP library v. 3.0. Database 2 was composed of the MSPs created from the CBS strains. Databases 3 to 6 were combinations of database 1 and/or 2 with the MSPs of selected clinical isolates.

	Database 1	Database 2	Database 3	Selected clinical isolates used to generate MSPs	Database 4	Database 5	Database 6
			Database 1 plus 2		Database 1 plus clinical isolates	Database 2 plus clinical isolates	Database 1 plus clinical isolates
Total no. of MSP	11	18	29	7	18	25	36
<i>T. asahii</i>	N=2	N=2	N=4	DLC07	N=3	N=3	N=5
	35 VM, 29 VML	CBS8972, CBS7631					
<i>T. asteroides</i>	None	N=1	N=1	None	N=1	N=1	N=1
		CBS2481					

	Database 1	Database 2	Database 3	Selected clinical isolates used to generate MSPs	Database 4	Database 5	Database 6
			Database 1 plus 2		Database 1 plus clinical isolates	Database 2 plus clinical isolates	Database 1 plus clinical isolates
<i>T. coremiiforme</i>	None	N=1 CBS2482	N=1	FR29	N=1	N=2	N=2
<i>T. cutaneum</i>	N= 2 95PSB, 120PSB	N=1 CBS2466	N=3	None	N=3	N=1	N=3
<i>T. dermatis</i>	None	N=2 CBS 2043, CBS10495	N=2	F0801	N=1	N=3	N3
<i>T. deubeummannianum</i>	N=1 VML	None	N=1	None	N=1	None	N=1

	Database 1	Database 2	Database 3	Selected clinical isolates used to generate MSPs	Database 4	Database 5	Database 6
			Database 1 plus 2		Database 1 plus clinical isolates	Database 2 plus clinical isolates	Database 1 plus clinical isolates
<i>T. domesticum</i>	None	N=1	N=1	None	None	N=1	N=1
		CBS8280					
<i>T. faecale</i>	None	N= 1	N=1	IAL03	N=1	N=2	N=2
		CBS4828					
<i>T. inkin</i>	N=1	N=1	N=2	DLC11	N=2	N=2	N=3
	RVC 081VML	CBS7630					
<i>T. japonicum</i>	None	N=1	N=1	None	None	N=1	N=1
		CBS 8641					

	Database 1	Database 2	Database 3	Selected clinical isolates used to generate MSPs	Database 4	Database 5	Database 6
			Database 1 plus 2		Database 1 plus clinical isolates	Database 2 plus clinical isolates	Database 1 plus clinical isolates
<i>T. jirovecii</i>	None	N=1	N=1	F2701	N=1	N=2	N=2
		CBS6864					
<i>T. lactis</i>	None	N= 1	N=1	None	None	N=1	N=1
		CBS9051					
<i>T. loubieri</i>	None	N=1	N=1	None	None	N=1	N=1
		CBS7719					
<i>T. montevidense</i>	None	N=1	N=1	F0501	N=1	N=2	N=2
		CBS 8605					

	Database 1	Database 2	Database 3	Selected clinical isolates used to generate MSPs	Database 4	Database 5	Database 6
			Database 1 plus 2		Database 1 plus clinical isolates	Database 2 plus clinical isolates	Database 1 plus clinical isolates
<i>T. mucoides</i>	N=2 DSM12017, ATCC204094	N=1 CBS7625	N=3	None	N=2	N=1	N=3
<i>T. mycotoxinovorans</i>	None	N=1 CBS9756	N=1	None	None	N=1	N=1
<i>T. ovoides</i>	N=1 VML	N=1 CBS7556	N=2	None	N=1	N=1	N=2
<i>Trichosporon sp</i>	N=2 122PSB, 128PSB	None	N=2	None	N=2	None	N=2

Case report

Invasive *Trichosporon* infection in solid organ transplant patients: a report of two cases identified using IGS1 ribosomal DNA sequencing and a review of the literature

J.N. Almeida Júnior, A.T.W. Song, S.V. Campos, T.M.V. Strabelli, G.M. Del Negro, D.S.Y. Figueiredo, A.L. Motta, F. Rossi, J. Guitard, G. Benard, C. Hennequin. Invasive *Trichosporon* infection in solid organ transplant patients: a report of two cases identified using IGS1 ribosomal DNA sequencing and a review of the literature. *Transpl Infect Dis* 2014. All rights reserved

Abstract: *Trichosporon* species are rare etiologic agents of invasive fungal infection in solid organ transplant (SOT) recipients. We report 2 well-documented cases of *Trichosporon inkin* invasive infection in SOT patients. We also conducted a detailed literature review of *Trichosporon* species infections in this susceptible population. We gathered a total of 13 cases of *Trichosporon* species infections. Any type of organ transplantation can be complicated by *Trichosporon* infection. Bloodstream infections and disseminated infections were the most common clinical presentations. Liver recipients with bloodstream or disseminated infections had poor prognoses. Although the most common species was formerly called *Trichosporon beigelii*, this species name should no longer be used because of the changes in the taxonomy of this genus resulting from the advent of molecular approaches, which were also used to identify the strains isolated from our patients. Antifungal susceptibility testing highlights the possibility of multidrug resistance. Indeed, *Trichosporon* has to be considered in cases of breakthrough infection or treatment failure under echinocandins or amphotericin therapy. Voriconazole seems to be the best treatment option.

J.N. Almeida Júnior^{1,2}, A.T.W. Song³, S.V. Campos⁴, T.M.V. Strabelli⁵, G.M. Del Negro⁶, D.S.Y. Figueiredo⁶, A.L. Motta¹, F. Rossi¹, J. Guitard^{2,7,8}, G. Benard⁶, C. Hennequin^{2,7,8}

¹Divisão de Laboratório Central – LIM03, Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, Brazil, ²INSERM, UMRS945, Paris, France, ³Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, Brazil, ⁴Lung Transplant Group, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, Brazil, ⁵Heart Transplant Group, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, Brazil, ⁶Mycology Laboratory – UM-53, Instituto de Medicina Tropical, FMUSP, São Paulo, Brazil, ⁷UMR S945, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France, ⁸APHP, Hôpital St Antoine, Service de Parasitologie-Mycologie, Paris, France

Key words: *Trichosporon*; invasive infection; solid organ transplant; antifungal susceptibility; treatment

Correspondence to:
João Nobrega de Almeida Júnior, Laboratório de Microbiologia, DLC, PAMB, Instituto Central, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – Cerqueira César, São Paulo 05403-000, Brazil
Tel: +55 11 2661 6158/2661 6372
Fax: +55 11 2661 6372
E-mail: jnaj99@gmail.com

Received 12 March 2013, revised 26 June 2013,
16 September 2013, accepted for publication
6 October 2013

DOI: 10.1111/tid.12179
Transpl Infect Dis 2014; **0**: 1–6

Invasive fungal infections (IFIs) occurring in solid organ transplant (SOT) patients are associated with significant morbidity and mortality (1, 2). *Candida* and *Aspergillus* remain the most common pathogens in this setting; however, possibly because of the increasing

exposure to antifungal drugs, more diverse pathogens are now being isolated from these patients (3, 4).

Trichosporon species are ubiquitous basidiomycetes that can colonize the gastrointestinal tract, the respiratory airways, and the skin (5). *Trichosporon*

is a well-known pathogen in patients with hematologic malignancies (6), but has rarely been reported in SOT patients (7–19). We report 2 new cases of *Trichosporon* infection in SOT patients, which were identified using new molecular tools, and review the literature. The main clinical and therapeutic features of these infections that complicate the course of SOT, and the new *Trichosporon* taxonomy are discussed.

Case reports and methods

Case 1

A 19-year-old man with end-stage respiratory failure caused by cystic fibrosis was admitted in April 2010 for bilateral lung transplantation. Immunosuppressive therapy with tacrolimus, azathioprine, and prednisone was started. Antifungal prophylaxis consisted of inhaled amphotericin B (10 mg/kg twice a day) and itraconazole (200 mg twice a day), because he was previously colonized with *Aspergillus* species. Two weeks later, he developed acute graft rejection, and received high-dose corticosteroid boluses (methylprednisolone 10 mg/kg/day for 3 days). In the meantime, a cytomegalovirus systemic infection was diagnosed, leading to the initiation of ganciclovir therapy (5 mg/kg twice a day). His clinical condition improved, but 3 months after transplantation, he developed a fever along with inflammation of the sternal surgical wound. A computed tomography (CT) scan showed signs of sternum osteomyelitis and an empyema located at the anterior mediastinum and pericardium. During the surgical drainage of these collections, 5 mL of purulent material was withdrawn. Direct examination of this pus revealed hyaline septate hyphae, but the sample tested negative for bacteria.

The culture was positive 48 h later for yeast-like colonies further identified as *Trichosporon inkin* by the API20AUX panel (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Voriconazole therapy led to defervescence and improvement in the local signs of inflammation after 24 h. A reduction in tacrolimus dosage was necessary because of elevated blood trough levels. The patient received intravenous voriconazole (4 mg/kg) every 12 h for 42 days, followed by maintenance therapy with oral voriconazole (200 mg twice a day) for 8 months. No voriconazole toxicity could be detected. A follow-up CT scan performed 6 months later showed a complete regression of inflammatory signs in the sternum and the mediastinum. The patient is well, 3 years after transplantation.

Case 2

A 42-year-old man was admitted in June 2010 for cardiac transplantation because of idiopathic dilated cardiomyopathy. The post-surgical immunosuppression regimen consisted of a combination of prednisone and cyclosporine. Fourteen days after the surgery, while receiving imipenem and vancomycin, he developed fever and clinical signs suggestive of pneumonia. A thoracic CT scan revealed bilateral bronchoalveolar infiltrates and a right-sided pleural effusion. Direct examination of the pleural exudate was negative for bacterial and fungal elements.

The cultures were positive 3 days later for the presence of yeast-like colonies further identified as *T. inkin* by API20AUX (bioMérieux). The patient was initially treated with fluconazole (400 mg twice a day); 10 days later, the treatment was changed to voriconazole (200 mg twice a day) for an additional 14 days. The patient rapidly recovered, and a follow-up CT scan performed at the end of voriconazole therapy confirmed resolution of the pulmonary and pleural signs. However, the patient's clinical condition deteriorated further because of cytomegalovirus-induced colitis leading to intestinal occlusion and sepsis, and he died 57 days after transplantation.

Mycological study

To confirm the species identification, direct sequencing of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 region (IGS1 rDNA) was performed according to a previously published protocol (20). Antifungal susceptibility testing was carried out using the Etest method (bioMérieux) following the manufacturer's recommendations (RPMI agar plate, an inoculum of $1-5 \times 10^6$ colony-forming units/mL, incubation at 37°C, and reading after 48 h). Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the following guidelines: 80% growth inhibition for azole derivatives, and 100% for amphotericin B and caspofungin. IGS1 rDNA sequencing allowed the identification of *T. inkin* in our 2 cases (100% identity with Genbank accession number FJ153608.1). The antifungal susceptibility testing is described in Table 1.

Literature search

An electronic search was performed in the PubMed database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the key words "Trichosporon," "infection," "transplantation,"

Minimal inhibitory concentrations (MICs) of *Trichosporon inkin* strains collected from the 2 patients described in this report

Case	MICs (mg/L)					
	Amphotericin	Fluconazole	Caspofungin	Posaconazole	Voriconazole	Itraconazole
1	1	3	>32	1	0.047	6
2	2	3	>32	1.5	0.064	4

MICs were determined using the Etest method on RPMI agar plates as recommended by the manufacturer (bioMérieux).

Table 1

and one of the following terms: "liver," "kidney," "lung," "heart," "intestinal," "multivisceral," or "small bowel." No date limits were applied. Only proven or probable invasive fungal infections, according to EORTC/MSG classification (21), were selected.

Results

In the English-language literature, we found 17 cases of *Trichosporon* infections that complicated the course of SOT (7–19); 6 cases (5 urinary tract infections and 1 superficial surgical wound infection) (13, 17), which did not match the definition of proven or probable IFI, were excluded from the analysis.

Clinical manifestations

The clinical charts of the 11 retained cases and our own 2 cases are summarized in Table 2 (7–12, 14–16, 18, 19). The first observation was reported in 1989, and 10 cases were reported during the last decade. The literature reports that these infections complicated the course of liver (5 cases), kidney (3 cases), heart (1 case), heart–kidney (1 case), and lung–liver (1 case) transplants. The patients' ages ranged from 19 to 64 years. Ten (77%) were men. Four cases were described in the early period (30 days after transplantation), and 3 occurred after 1 year. All but 2 patients received or had received antibiotic therapy during the month preceding the diagnosis of *Trichosporon* infection. Three patients were co-infected with other pathogens: *Staphylococcus epidermidis* bloodstream infection (15), disseminated infection (invasive infection with at least 2 non-contiguous infected sites) with *Scedosporium apiospermum* and *Aspergillus fumigatus* (19), and an infection with *Serratia marcescens* (7). Bloodstream infection, disseminated infections, and disseminated skin lesions were the most common clinical presenta-

tions of *Trichosporon* infections (8 cases). Skin lesions were described in 4 cases (7, 9, 11, 12).

In 2 cases, *Trichosporon* infection emerged while the patients were receiving antifungal agents: caspofungin on 1 case and fluconazole in the other case (11, 19). Three patients with disseminated infections were treated with amphotericin, but died. All 5 liver transplant patients died; 4 had non-controlled *Trichosporon* infections. Three patients were treated with voriconazole and 2 of these patients survived the infection.

Causative species and *in vitro* susceptibility testing

A molecular approach, targeting either IGS1 region (3 cases) or ITS region (1 case), was used to identify *T. inkin* in our 2 cases (100% identity with Genbank accession number FJ153608.1), and to identify *Trichosporon asahii* and *Trichosporon mycotoxinovorans* in 1 case each in the literature (16, 19).

The methods used for *in vitro* susceptibility testing differed from one report to another. However, susceptibility patterns revealed high MICs of amphotericin B (ranging from 0.06 to 16 mg/L) and candins (≥ 32 μ g/mL for caspofungin and >8 μ g/mL for anidulafungin), and mainly low MICs against azole derivatives (2–16 μ g/mL of fluconazole, <0.03 to >32 μ g/mL of voriconazole, <0.03 to 24 μ g/mL of posaconazole, and 0.125 to >32 μ g/mL of itraconazole).

Discussion

Trichosporon is the second most common human basidiomycetous pathogen after *Cryptococcus neoformans* (22). It has been implicated in disseminated infections, pneumonia, skin and soft tissue infections, and intra-abdominal abscesses, primarily in hematologic patients (6, 23–25). Invasive *Trichosporon* infections appear far less frequently in SOT patients, suggesting

Clinical and epidemiological aspects of invasive *Trichosporon* infections in solid organ transplant patients

(Ref) Year	Country	Species identification after positive culture	Organ transplanted	Gender/age in years	Site of infection	Time after transplant	Comorbidities	Previous ATB/ATF	Treatment (days)	Infection outcome
(7) 1989	USA	<i>T. beigelli</i>	Liver	M/25	Disseminated infection ¹ , skin	2 days	Neutropenia, hepatic failure, <i>Serratia marcescens</i> coinfection	Yes/No	Amb (12)	Death
(8) 1989	USA	<i>T. beigelli</i>	Liver	M/39	CRBSI	7 days	Dialytic renal failure	Yes/No	Amb (8)	Death
(9) 1993	Pakistan	<i>T. beigelli</i>	Kidney	M/45	Disseminated skin lesions	6 months	Diabetes mellitus	Yes/No	Flu (14)	Improved
(10) 2000	Italy	<i>T. beigelli</i>	Heart	NA	Pneumonia	NA	NA	NA	NA	NA
(11) 2003	USA	<i>T. mucoides</i>	Heart-kidney	M/64	Disseminated skin lesions	17 years 6 months	Neutropenia	Yes/Yes	Flu (3), Amb (3), Flu (36)	Improved
(12) 2005	Brazil	<i>T. asahi</i>	Liver	F/51	Disseminated infection, skin	4 years	Leukemia	Yes/No	Amb (16)	Death
(14) 2008	Argentina	<i>T. asahi</i>	Liver	F/23	Intra-abdominal	6 years	Diabetes mellitus	Yes/Yes	Amb (NA), Flu+Cas (NA)	Death
(15) 2009	USA	<i>T. mucoides</i>	Liver	M/51	Bloodstream	134 days	Renal failure, <i>Staphylococcus epidermidis</i> coinfection, graft rejection	Yes/No	Flu (NA), Anid (NA), Pos (NA)	Improved
(16) 2009	Brazil	<i>T. asahi</i> ²	Kidney	M/33	Bloodstream	NA	NA	NA	NA	NA
(18) 2011	Qatar	NA	Kidney	M/40	Graft arteritis	18 days	NA	NA	Pos (84)	Improved
(19) 2012	France	<i>T. mycotoxinovorans</i> ³	Lung/liver	M/35	Disseminated infection	9 days	Cystic fibrosis, <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Scedosporium apiospermum</i> coinfection	Yes/Yes	Cas (29) + Vor (15)	Improved
PR1, 2010	Brazil	<i>T. ink</i> ²	Lung	M/19	Sternum osteomyelitis	85 days	Cystic fibrosis, diabetes	Yes/No	Vor (240)	Improved
PR2, 2010	Brazil	<i>T. ink</i> ²	Heart	M/42	Pneumonia	63 days	Renal failure	Yes/No	Flu (10), Vor (14)	Improved

¹Disseminated infection: Invasive infection with at least 2 non-contiguous infected sites.²Identification by sequencing rDNA IGS1 region.³Identification by sequencing rDNA ITS1 region.

Ref, reference; ATB, antibiotic; ATF, antifungal; M, male; AMB, amphotericin deoxycholate; CRBSI, catheter-related bloodstream infection; Flu, fluconazole; NA, data not available; F, female; Cas, caspofungin; Anid, anidulafungin; Pos, posaconazole; Vor, voriconazole; PR, present report.

Table 2

that neutropenia may be an important predisposing factor. Recently, 2 large multicenter studies in North America focused on IFIs in SOT recipients, but did not report any cases of *Trichosporon* infections among 1723 cases of infections (1, 2). Invasive *Trichosporon* infections seem to be more prevalent in South America (13, 16, 26–28). Girmenia et al. (6), who analyzed 287 cases of invasive *Trichosporon* infection in immunocompromised patients through 2004, found that only 2.1% of the cases came from South America. Nevertheless, after 2005, the great majority of these infections were described in South America (12, 13, 16, 27). One can hypothesize that climate (elevated temperatures and humidity) may favor the proliferation of this microorganism. Indeed, Ruan et al. (29) reported a higher number of *Trichosporon* isolates in a Taiwan hospital during months with mean temperatures of 20–30°C.

Analysis of the 11 cases of invasive *Trichosporon* infections retrieved in the PubMed search and of our own cases shows that the course of any type of transplantation could be complicated by this type of infection. The clinical presentation varied, but fever of unknown origin and skin lesions were the most frequent features. Considering the number of cases collected and the frequency of associated comorbidities, it was not possible to specify prognosis factors. It is notable that all 5 liver transplant recipients had a fatal outcome and, in 4 of them, death was directly related to the *Trichosporon* infection.

The natural resistance of the genus to various antifungal drugs should be underlined and, together with the fact that *Trichosporon* infection is not initially considered, can result in delayed and inappropriate antifungal treatment. However, Hosoki et al. (30) resolved this issue by using a PCR assay directly on a serum sample of a neutropenic patient with *T. asahii* bloodstream infection. Like other basidiomycetous agents, candins do not exhibit any activity on *Trichosporon* species. Although reference methods such as EUCAST or CLSI have not yet defined cutoff points for *Trichosporon* species, a literature review shows that *T. asahii* and *Trichosporon faecale* exhibit MICs suggestive of resistance against amphotericin, whereas *Trichosporon ovoides* and *Trichosporon dermatis* may be more susceptible to this drug (26, 27). Azole drugs thus appear to be the best choice, but strains within a given species have variable susceptibility to fluconazole (16, 26, 27). However, the new triazoles (voriconazole and posaconazole) seem to maintain efficacy against *Trichosporon* with the MIC₅₀ of voriconazole estimated at 0.03–0.5 µg/mL based on reports in the literature (27, 29). This finding correlates with the therapeutic success achieved in our 2 patients who were treated with voriconazole.

Nevertheless, the clinical data available from SOT patients do not indicate the best therapeutic approach. These data, combined with the data from onco-hematologic patients, just suggest that therapeutic regimens including an azole derivative may lead to a better prognosis (6, 24).

Species-dependent susceptibility supports the need for a definitive identification at the species level. This definitive identification may be difficult using biochemical panels or even the Vitek system (personal unpublished data) because the databases do not include all the species involved in human infections or are obsolete. Indeed, *Trichosporon beigelii* was the most frequently cited etiologic agent, but this taxon was replaced by several species after the advent of molecular identification. The genus now encompasses >50 species, 16 of which were isolated from human samples (5). The most frequent species related to human infections are *T. asahii* and *T. inkin*, but rarer species, such as *T. mycotoxinovorans* (the etiologic agent of pneumonia in a patient who received a lung transplant) have been described based on rDNA sequencing (19). Among the different regions from rDNA that could be sequenced for *Trichosporon* species identification, IGS1 has the most discriminative power to distinguish closely related ones (20).

Even though it is a rare etiologic agent of IFIs in SOT recipients, *Trichosporon* has to be considered in cases of breakthrough infection or treatment failure under echinocandins or amphotericin therapy. Invasive *Trichosporon* infection in liver transplant patients could be associated with worse outcomes. Multidrug resistance has to be considered, and voriconazole should be recommended as first-line therapy.

Acknowledgements:

Author contributions: J.N.A.J. acquired the data, performed the literature review, and drafted the paper; A.T.W.S. performed the literature review and drafted the paper; S.V.C., T.M.V.S., G.M.D.N., D.S.Y.F., and A.L.M. acquired the data; F.R. and J.G. contributed to the research design; C.H. contributed to the research design, the literature review, and the drafting of the paper. All the authors critically revised the paper and approved the final submitted version.

References

1. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the

- Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). Clin Infect Dis 2010; 50 (8): 1101–1111.
2. Neofytos D, Fishman JA, Horn D, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. Transpl Infect Dis 2010; 12 (3): 220–229.
 3. Cuenca-Estrella M, Bernal-Martínez L, Isla G, Gomez-Lopez A, Alcazar-Fuoli L, Buitrago MJ. Incidence of zygomycosis in transplant recipients. Clin Microbiol Infect 2009; 15 (Suppl 5): 37–40.
 4. Park BJ, Pappas PG, Wannemuehler KA, et al. Invasive non-*Aspergillus* mold infections in transplant recipients, United States, 2001–2006. Emerging Infect Dis 2011; 17 (10): 1855–1864.
 5. Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. Clin Microbiol Rev 2011; 24 (4): 682–700.
 6. Girmenia C, Pagano L, Martino B, 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 2005; 43 (4): 1818–1828.
 7. Ness MJ, Markin RS, Wood RP, Shaw BW Jr, Woods GL. Disseminated *Trichosporon beigelii* infection after orthotopic liver transplantation. Am J Clin Pathol 1989; 92 (1): 119–123.
 8. Finkelstein R, Singer P, Lefler E. Catheter-related fungemia caused by *Trichosporon beigelii* in non-neutropenic patients. Am J Med 1989; 86 (1): 133.
 9. Mirza SH. Disseminated *Trichosporon beigelii* infection causing skin lesions in a renal transplant patient. J Infect 1993; 27 (1): 67–70.
 10. Grossi P, Farina C, Flocchi R, Dalla Gasperina D. Prevalence and outcome of invasive fungal infections in 1,963 thoracic organ transplant recipients: a multicenter retrospective study. Italian Study Group of Fungal Infections in Thoracic Organ Transplant Recipients. Transplantation 2000; 70 (1): 112–116.
 11. Nettles RE, Nichols LS, Bell-McGuinn K, Pipeling MR, Scheel PJ Jr, Merz WG. Successful treatment of *Trichosporon mucoides* infection with fluconazole in a heart and kidney transplant recipient. Clin Infect Dis 2003; 36 (4): E63–E66.
 12. Abdala E, Lopes RI, Chaves CN, Heins-Vaccari EM, Shikanai-Yasuda MA. *Trichosporon asahii* fatal infection in a non-neutropenic patient after orthotopic liver transplantation. Transpl Infect Dis 2005; 7 (3–4): 162–165.
 13. Rodrigues G da S, de Faria RRU, Guazzelli LS, Oliveira F de M, Severo LC. [Nosocomial infection due to *Trichosporon asahii*: clinical revision of 22 cases]. Rev Iberoam Micol 2006; 23 (2): 85–89.
 14. Biasoli MS, Carlson D, Chiganer GJ, et al. Systemic infection caused by *Trichosporon asahii* in a patient with liver transplant. Med Mycol 2008; 46 (7): 719–723.
 15. Lacasse A, Cleveland KO. *Trichosporon mucoides* fungemia in a liver transplant recipient: case report and review. Transpl Infect Dis 2009; 11 (2): 155–159.
 16. Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo ASA, Colombo AL. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol 2009; 47 (4): 1074–1081.
 17. Sundaram M, Anandbabu K, Basu G, Devasia A, Tamilarasi V. *Trichosporon* surgical wound infection in a renal allograft recipient successfully treated with voriconazole. Transplantation 2010; 90 (5): 588–589.
 18. Fadhil RAS, Al-Thani H, Al-Maslami Y, Ali O. *Trichosporon* fungal arteritis causing rupture of vascular anastomosis after commercial kidney transplantation: a case report and review of literature. Transplant Proc 2011; 43 (2): 657–659.
 19. Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, et al. Disseminated *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Scedosporium apiospermum* coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient. J Clin Microbiol 2012; 50 (12): 4168–4170.
 20. Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. J Clin Microbiol 2002; 40 (5): 1826–1830.
 21. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46 (12): 1813–1821.
 22. Pfaffer MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol 2009; 47 (1): 117–123.
 23. Kontoyiannis DP, Torres HA, Chagua M, et al. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. Scand J Infect Dis 2004; 36 (8): 564–569.
 24. Suzuki K, Nakase K, Kyo T, et al. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. Eur J Haematol 2010; 84 (5): 441–447.
 25. Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. J Infect 2012; 64 (1): 68–75.
 26. Rodríguez-Tudela JL, Díaz-Guerra TM, Mellado E, et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49 (10): 4026–4034.
 27. Araujo Ribeiro M, Alastruey-Izquierdo A, Gomez-Lopez A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Molecular identification and susceptibility testing of *Trichosporon* isolates from a Brazilian hospital. Rev Iberoam Micol 2008; 25 (4): 221–225.
 28. Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, et al. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. Rev Argent Microbiol 2011; 43 (3): 176–185.
 29. 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 2009; 49 (1): e11–e17.
 30. Hosoki K, Iwamoto S, Kumamoto T, Azuma E, Komada Y. Early detection of breakthrough trichosporonosis by serum PCR in a cord blood transplant recipient being prophylactically treated with voriconazole. J Pediatr Hematol Oncol 2008; 30 (12): 917–919.

5. DISCUSSÃO

A identificação precoce e precisa dos patógenos responsáveis por infecções graves como IFI têm impacto importante em morbi-mortalidade ^{40,41}. A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) recomenda que as equinocandinas sejam primeira escolha para tratamento das candidemias moderadamente graves ou graves ⁴². *Trichosporon* é o segundo gênero de levedura responsável por fungemia em pacientes neutropênicos com doença onco-hematológica, e a mortalidade atribuída nesta população pode ser próxima de 100% ^{11,43}. A resistência intrínseca às equinocandinas e a demora no diagnóstico podem ser fatores contribuintes.

A tecnologia de espectrometria de massa por MALDI-TOF surge como uma nova ferramenta para os laboratórios de microbiologia, e a identificação dos patógenos diretamente de hemoculturas pode diminuir o tempo de liberação de resultados (*turn around time*) de forma expressiva. Recentemente, Huang *et al.* demonstraram que aliar a informação precoce de uma identificação de patógeno diretamente de hemocultura por EM MALDI-TOF à equipe de especialistas de prescrição de antimicrobianos, reduziu a mortalidade de 20,3% para 14,5% em casos de infecção de corrente sanguínea (ICS) num hospital norte-americano ⁴¹.

Os métodos fenotípicos, como as galerias API 20AUX®, API 32ID® ou aparelhos automatizados como Vitek 2® ou Pheonix®, disponíveis em laboratórios de rotina, contêm apenas três espécies de *Trichosporon* em seus bancos de dados (*T. asahii*, *T. inkin*, *T. mucoides*) ¹¹. A limitação do número de espécies contempladas pode gerar erros de identificação de gênero, informação que pode ser catastrófica se não corrigida por micologistas experientes. Os isolados provenientes de diversos laboratórios franceses utilizados neste estudo foram submetidos à identificação fenotípica por diferentes metodologias, o que impossibilitou a comparação do desempenho de identificação de espécies de *Trichosporon* entre os métodos.

Em relação à identificação por espectrometria de massa, condições pré-analíticas como tempo de incubação, temperatura e meio de cultura não foram comparadas. As extrações foram realizadas a partir de colônias obtidas de cultura em meio SDA com gentamicina e cloranfenicol (BioRad, França) e incubação a 30°C por 48 horas. Já para a confecção de um espectro de referência, teve-se o cuidado de utilizar 20 espectros de massa provenientes de 4 repiques diferentes da mesma cepa, criando ER

com 75 a 100 picos. Estudo publicado por Normand *et al.* (2013), depois da finalização deste trabalho, analisou diferentes parâmetros para a construção de base de dados de ER (Microflex LT, Bruker Daltonics/BD) para identificação de fungos filamentosos, como número de EM por ER, número de ER por cepa e número de cepas por espécie inseridas na base de dados ⁴⁴. A primeira conclusão foi a demonstração da heterogeneidade de picos obtidos a partir de repiques diferentes da mesma cepa, utilizando mesmo meio, temperatura e tempo de incubação. Apesar de tais análises terem sido realizadas com fungos filamentosos, fungos do gênero *Trichosporon* podem formar diferentes estruturas como blastoconídeos, apressórios, hifas, pseudo-hifas e artroconídeos, e tal variabilidade de expressão morfológica pode refletir-se nos EMs; por tal motivo, optou-se por gerar EMs para a construção de ERs a partir de diferentes repiques. Mas os dados principais obtidos do estudo de Normand *et al.* que poderiam ter sido aplicados neste estudo, seriam a criação de quatro ERs por cepa, 40 EM por ER ⁴⁴.

A comparação de diferentes protocolos de extração e a determinação daquele com melhor desempenho foi importante para a qualidade dos espectros de massa obtidos, que puderam distinguir espécies próximas como *T. asahii* e *T. coremiiforme*.

Para obtenção de espectros de massa de leveduras, a análise realizada diretamente das colônias, sem extração em tubo com ácido fórmico, produz resultados inferiores quando comparada com aquelas realizadas após extrações ³⁸. A técnica de extração com ácido fórmico realizada diretamente nos depósitos das placas não foi exequível, pois algumas espécies, como *Trichosporon ovoides*, possuem colônias rígidas e aderidas ao ágar, impossibilitando a confecção de depósitos homogêneos. As técnicas de extração em tubo, com etanol e posteriormente ácido fórmico, tiveram bom desempenho, com valores de LS superiores a 2.0. No entanto, o desempenho dos protocolos descritos por Cassagne *et al.* (2011) e Sendid *et al.* (2013) revelaram valores de LS superiores ao protocolo descrito pelo fabricante. Somente o deste último resultou em diferença estatística significativa quando comparado ao protocolo recomendado pelo fabricante (Bruker Daltonics/BD) ^{39,45}. Tal diferença pode ser atribuída ao maior tempo de incubação do sedimento com ácido fórmico. Porém, não houve diferença estatística entre os protocolos descritos por Cassagne *et al.* e Sendid *et al.*, e é aceitável o argumento de que o tempo de incubação expressivamente maior do último protocolo não seria factível com uma análise em laboratório de rotina ^{39,45}.

Outros protocolos de extração descritos para identificação de fungos filamentosos, com ruptura mecânica através de miçangas de sílica, ou para actinomicetos, através de fervura, não foram comparados devido aos bons resultados obtidos previamente com técnicas menos trabalhosas^{46,47}.

A criação de diferentes bases/banco de dados (n=6) teve como objetivo comparar o desempenho de combinações de ERs que produzissem os melhores resultados para identificação dos isolados clínicos. O principal achado foi o desempenho ruim da base de dados Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics/BD). Para dez isolados não foi possível a identificação de gênero pelos ERs originais do Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics/BD), sendo três pertencentes à espécie *T. inkin*, espécie representada pelo referido banco de dados.

Trichosporon inkin, descrito como um dos agentes etiológicos de piedra branca, pode estar relacionado à fungemia em pacientes onco-hematológicos, e pela primeira vez foi identificado como responsável por IFI em pacientes transplantados de pulmão ou coração^{22,48}. A não identificação de gênero pelo banco de dados Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics/BD) pode gerar uma opção equivocada do tratamento antifúngico, que somada a um quadro de imunodepressão, teria impacto negativo no prognóstico de tais infecções. Também foram caracterizados erros de identificação pelo banco de dados Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics/BD) para isolados de *T. asahii* identificados como *T. cutaneum*, com valores de LS superiores a 2,0. Os ERs *T. cutaneum* 95 PSB e 120PSB desse banco de dados foram submetidos à identificação (comando *MSP identification*) através da comparação com os ERs do banco de dados *in-house*, e os resultados mostraram que seus perfis proteômicos são compatíveis com *T. asahii*. Alguns estudos encontraram concentrações inibitórias mínimas elevadas para anfotericina B em isolados de *T. asahii*, o que tornaria importante a caracterização da espécie para decisão terapêutica^{49,50}.

A distinção entre os genótipos de *T. asahii* não foi estudada através da EM MALDI-TOF, porém tal análise foi realizada anteriormente, e não houve correlação com os genótipos caracterizados pelo sequenciamento da região IGS1⁵¹. Porém, mesmo a análise de árvores filogenéticas criadas a partir de sequências de nucleotídeos da região IGS1 mostra a proximidade entre os genótipos 1 e 2, 4 e 5, com valores de “bootstrap” inferior a 90, o que justificaria a não diferenciação pela EM^{25,51}.

Trichosporon dermatis não está presente no banco de dados original apesar de ser uma das espécies mais prevalentes do gênero encontradas em amostras clínicas ¹¹. Dezenove isolados foram classificados como *T. mucoides*, treze deles com valores de LS superior a 2,0. Dois isolados foram erroneamente classificados como *T. ovoides*, com valores de LS superior a 2,0. Os ERs *T. mucoides* DSM12017 e ATCC204094, e *T. ovoides* VML também foram submetidos à identificação através da comparação com ERs do banco de dados *in-house*, e evidenciou-se a similaridade com a espécie *T. dermatis*. No Anexo A encontram-se as identificações dos ERs da base de dados Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics/BD) que foram relacionados aos erros de identificação com valores de LS superior a 2,0 e que foram submetidos à comparação com os ERs do banco de dados *in-house*.

Recentemente Kolečka *et al.* (2013) submeteram leveduras artrosporadas à identificação por EM MALDI-TOF, utilizando cepas de referência da coleção CBS e de coleções de hospitais da Grécia, Romênia e Qatar, e após atualização da base de dados original com 65 ERs, 92,2% dos basidiomicetos tiveram identificação correta, porém com erros de caracterização de isolados filogeneticamente próximos como *T. inkin/T. ovoides*, *T. japonicum/T. asteroides* e *T. dermatis/T. mucoides* ⁵¹. O critério de especiação utilizado foi o sequenciamento da região ITS1 e D1/D2 do rDNA, o que contribui para o desempenho inferior de identificação em comparação aos dados de nosso estudo. Sugita *et al.* em 2002 demonstrou que o sequenciamento da região IGS1 do rDNA tem poder discriminatório maior para definir espécies próximas que podem não ser separadas pela comparação de sequências de nucleotídeos das regiões ITS e D1/D2 do rDNA ²⁸. A qualidade dos ERs criados para este estudo a partir de cepas que tiveram sequenciamento da região IGS1 pode ser evidenciada em árvore filogenética, que demonstrou separação nítida entre os clados e espécies (**Anexo B**).

O sequenciamento da região ITS do rDNA pode ser considerado como o código de barras para identificação de fungos e por tal a região é amplamente estudada em micologia ⁵². Sequências de nucleotídeos da região ITS de cepas de *Trichosporon* disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) podem citar espécies equivocadas, já que, como citado anteriormente, tal região não tem poder discriminatório para espécies correlatas ²⁸. De maneira similar, Kong *et al.* (2009) ao estudarem a identificação de espécies de *Nocardia*, demonstraram que uma sequência de nucleotídeos da região 16S do rDNA depositada como *N. otitisdiscavarium* (número

de acesso GenBank: X.80611) pode ter sido mal identificada, já que diversos isolados de *N. farcinica* tiveram 100% de identidade⁵³. Em caso semelhante, Gunn *et al.* (2006) descreveram ICS por *T. dermatis* que havia sido erroneamente classificado como *T. mucoides* pelo sequenciamento de pequenos fragmentos da região ITS1⁵⁴.

As espécies *T. mucoides* e *T. dermatis* apresentaram o maior desafio para a construção de um banco de ERs que pudesse discerni-las. A cepa CBS10495 foi adquirida como *T. mucoides*, mas seus espectros de massa foram semelhantes àqueles de isolados de *T. dermatis*, o que provocou nas análises iniciais diversos erros de identificação, que foram solucionados após sequenciamento da região IGS1. A cepa de referência ATCC 204094 foi utilizada para confecção do banco de dados de ER Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics/BD) e é comercializada como *T. mucoides*. Tal cepa é recomendada para controle de qualidade dos cartões YST do sistema VITEK2 (BioMérieux) e as identificações são reportadas como *T. mucoides*. Sequenciamento da região IGS1 revelou 99% de identidade com a cepa *T. dermatis* CBS2043 (número de acesso GenBank: AB066412.1). O banco de ERs *in-house*, que teve a inclusão das cepas *T. dermatis* CBS2043^T, *T. mucoides* CBS7625^T, *T. dermatis* F0801 e *T. dermatis* CBS10495, conseguiu discriminar 21 dos 22 isolados (95%) caracterizados como *T. dermatis* pelo sequenciamento da região IGS1. O isolado FR 16 foi classificado como *T. mucoides* pela espectrometria de massa, com valor de LS superior a 2,0. A cepa foi ressemeada em ágar cromogênico e, após verificação da pureza das colônias, foi novamente submetida à extração de DNA e sequenciamento da região IGS1, assim como todo procedimento de identificação por EM MALDI-TOF foi repetido. Houve a confirmação dos resultados anteriores e a possibilidade de contaminação ou troca de amostras foi descartada. Tal discordância levantou a hipótese de que a região IGS1 seria insuficiente para discernir as duas espécies e que uma análise *multilocus* poderia fornecer novas informações sobre a filogenia das duas espécies. A partir de informações obtidas de estudo que analisou genes de cópia única para distinção de fungos de classes diferentes, e através de sequências de nucleotídeos de *Trichosporon* spp. (locus RPB2, GenBank: JN989359.1, JN989347.1), do genoma de *Trichosporon asahii* (locus TSR1 GenBank: AMBO01000391.1) e de *Cryptococcus neoformans* (locus TSR1 GenBank: AA01000024.1), foram confeccionados oligonucleotídeos degenerados para sequenciamentos dos loci RPB2 e TSR1. As sequências obtidas seriam comparadas àquelas da região IGS1 previamente sequenciadas⁵⁵. As sequências foram alinhadas

através do programa ClustalX (versão 2.1) e ajustadas manualmente para obtenção das sequências consenso dos 23 isolados. Árvores filogenéticas foram construídas através do programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis software, version 4.0.2; <http://www.megasoftware.net>) pelo método *Neighbor Joining* e o valor de *bootstrap* foi calculado após 1000 replicações. *Trichosporon asahii* CBS8972 foi utilizado como grupo externo. As características filogenéticas das árvores obtidas a partir de sequências de nucleotídeos dos loci IGS1, RPB2 e TSR1 estão resumidas no **Anexo C** e a árvore filogenética obtida com concatenação de sequências dos três *loci* está explicitada no **Anexo D**.

O filograma ajudou a interpretar o possível erro da análise pela EM MALDI-TOF, mostrando que o isolado FR16 pode ser híbrido entre as espécies *T. mucoides* e *T. dermatis*, como *Cryptococcus neoformans* sorotipo A/D ⁵⁶. Os dois principais ramos da árvore filogenética foram diferenciados por valor de *bootstrap* superior a 90, potencializando a diferença entre eles. Entre o maior agrupamento de isolados, no qual está incluída a cepa *T. dermatis* CBS2043, foram diferenciados dois genótipos com valor de *bootstrap* de 96 entre eles. Esta é a primeira análise filogenética *multilocus* realizada com as espécies *T. dermatis* e *T. mucoides*, mostrando que a diferenciação entre elas pode ser mais complexa do que um simples sequenciamento da região IGS1. Porém, as sequências de nucleotídeos do locus RPB2 apresentaram baixo número de caracteres informativos para parcimônia (CIP) (*parsimony informative characters*), contribuindo de maneira menos expressiva para a separação filogenética. A região TSR1 apresentou a maior relação CIP por pares de bases e foi determinante para o resultado da análise. Schmitt *et al.* (2009) demonstraram que além do locus TSR1, o gene MCM7 pode ser importante para análises filogenéticas em fungos ⁵⁵. Apesar do sucesso com simulações de PCR *in silico* para a região mencionada, as reações posteriores foram infrutíferas e o locus não foi analisado. Com o advento do sequenciamento genômico, novos dados filogenéticos das espécies de *Trichosporon* serão revelados, e a presença de espécies híbridas ou de complexos com mais de duas subespécies poderão ser caracterizados ⁵⁷.

O banco de ERs 5 apresentou melhor desempenho, relacionado ao conjunto de espécies incluídas, à diversidade de ERs das espécies *T. inkin* e *T. dermatis*, e também pela exclusão de ERs da base de dados Biotyper 3.0. Uma nova versão do banco de

dados de ER da Bruker deverá ter melhorias e os espectros de referência que foram relacionados a erros de identificação deverão ser retirados.

Algumas espécies que constituíram o novo banco de ERs não foram representadas por espécimes clínicos e consequentemente não puderam ser submetidas à identificação, como por exemplo, *T. mycotoxinovorans*, *T. cutaneum*, *T. domesticum*, *T. japonicum* e *T. asteroides*. No entanto, os ERs produzidos a partir das cepas da coleção CBS não produziram erros de identificação, dado que indiretamente comprova a especificidade de cada ER gerado. *Trichosporon mycotoxinovorans* não foi citado como agente de infecção em humanos em recente artigo de revisão, mas tal espécie hoje é considerada como patógeno emergente em pacientes com fibrose cística^{11,12}. Chagas-Neto *et al* descreveram *T. asteroides* como a segunda espécie mais frequente em amostras de corrente sanguínea de pacientes de hospitais de São Paulo²⁵. Porém, não foi identificada tal espécie entre os isolados do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Instituto Adolfo Lutz.

6. CONCLUSÕES

A EM MALDI-TOF apresentou resultados similares aos produzidos pela identificação molecular considerada padrão-ouro para identificação das espécies de *Trichosporon* de importância médica após a confecção de banco de ERs *in-house*. No entanto, o baixo custo por análise e agilidade do resultado são vantagens em comparação à técnica molecular.

A extração realizada em tubos empregando álcool e posteriormente ácido fórmico é imprescindível para a obtenção de espectros de massa, e protocolos diferentes daquele descrito pelo fabricante (Bruker Daltonics/BD) produziram resultados de qualidade superior.

O banco de dados Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics/BD) não abrange todas as espécies de importância médica e contém ERs com identificação duvidosa que foram relacionados a erros de identificação de espécie.

O banco de ER *in-house* construído a partir de cepas CBS (n=18) e de origem clínica (n=7) apresentou melhor desempenho, relacionado à qualidade da identificação e consequentemente do ER, e do número maior de ERs para as espécies mais frequentes (*T. asahii*, *T. inkin*, *T. dermatis*).

Dois isolados de *T. inkin* foram pela primeira vez relacionados a infecções em pacientes transplantados de órgãos sólidos.

A taxonomia de fungos é complexa e sofre frequentes modificações à maneira que o contingente maior de fungos é estudado e que novas técnicas são utilizadas para discernir as espécies. Este estudo apresentou novas informações que podem ser úteis para a taxonomia dos fungos do gênero *Trichosporon*, principalmente com relação às espécies *T. mucoides* e *T. dermatis*.

7. ANEXOS

Anexo A. Identificação dos espectros de referência (ER) *Trichosporon cutaneum* PBB95, *T. cutaneum* PSB120, *T. ovoides* VML, *T. mucoides* ATCC204094 e *T. mucoides* DSM12017, por comparação com ERs do banco de dados *in-house*.

ER Biotyper 3.0 : Espécie proposta	Primeira ID* com ERs** <i>in house</i> (CBS ¹ e isolados clínicos) (Logscore)	Segunda ID* com ERs** <i>in house</i> (CBS ¹ e isolados clínicos) (Logscore)
<i>T. ovoides</i> VML	<i>T. dermatitis</i> F0801 (2.20)	<i>T. dermatitis</i> CBS10495 (1.95)
<i>T. mucoides</i> ATCC204094 THL	<i>T. dermatitis</i> CBS2043 (2.32)	<i>T. dermatitis</i> CBS10495 (2.08)
<i>T. mucoides</i> 12017DSM	<i>T. dermatitis</i> CBS10495 (2.22)	<i>T. dermatitis</i> F0801 (2.09)
<i>T. cutaneum</i> 120PSB	<i>T. asahii</i> CBS7631 (1.67)	<i>T. asahii</i> CBS8972 (1.41)
<i>T. cutaneum</i> 95PSB	<i>T. asahii</i> CBS7631 (2.26)	<i>T. asahii</i> CBS8972 (2.18)

*ID=Identificação; **ERs: espectros de referência; ¹Cepas de referência da coleção holandesa *Centraalbureau von Schimmelcultures*.

Anexo B. Árvore filogenética construída com pareamento de sequências de nucleotídeos da região IGS1 (320pb) por método de *neighbor-joining*. Espécies foram definidas após comparação com sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Cepa CBS10495, adquirida como *T. mucoides*, teve identificação modificada para *T. dermatis* após sequenciamento da região IGS1. *Cryptococcus neoformans* CBS132 foi utilizado como grupo externo. O valor de bootstrap foi calculado após 1000 replicações.

Anexo C. Diversidade genética e dados filogenéticos obtidos de árvores construídas com sequências dos loci IGS1, RPB2 e TSR1.

Locus	Tamanho do fragmento amplificado	Alelos	Polimorfismos	Grupos	Valores de <i>bootstrap</i>	CIP ¹ /pb
IGS1	425	1	0	<i>T. mucoide</i> (n=2)	1000	0.14
	425-426	4	1 inserção	<i>T. dermatitis</i> (n=20)	1000	
			2 substituições	Subgrupo de 5 isolados*	737	
RPB2	311	3	3 substituições	<i>T. mucoide</i> s (n=8)	606	0.012
	311	1	0	Subgrupo de 5 isolados*	953	
				<i>T. dermatitis</i> (n=14)	900	
TSR1	456	1	0	<i>T. mucoide</i> s (n=2)	1000	0.20
	452	2	7 substituições	<i>T. dermatitis</i> (n=20)	1000	
				Subgrupo de 5 isolados*	1000	

* Subgrupo de 5 isolados: FR25, FR02, F1801, F1301, F1601; ¹caracteres informativos para parcimônia por pares de base.

Anexo D. Árvore filogenética construída com concatenação de sequências de nucleotídeos dos loci IGS1, RPB2 e TSR1 (1146pb), obtida pelo método de *neighbor-joining*; sequências de *T. asahii* CBS8972 foram utilizadas como grupo externo. Valor de bootstrap calculado após 1000 replicações. Seta mostra isolado FR16 que foi caracterizado como *T. mucooides* pela espectrometria de massa MALDI-TOF e o sequenciamento da região IGS1 mostrou 99% de identidade com *T. dermatis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Behrend, G. 1890. Ueber Trichomycosis nodosa (Juhel-Rénoy): Piedra (Osorio). *Klin. Wschr.* 27:464–467.
2. Guého E, Smith MT, de Hoog GS, Billon-Grand G, Christen R, Batenburg-van der Vegte WH. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1992 May;61(4):289–316.
3. Stursová M, Zifčáková L, Leigh MB, Burgess R, Baldrian P. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012 Jun;80(3):735–46.
4. Wu Y, Du P-C, Li W-G, Lu J-X. Identification and molecular analysis of pathogenic yeasts in droppings of domestic pigeons in Beijing, China. *Mycopathologia*. 2012 Sep;174(3):203–14.
5. Hamad I, Sokhna C, Raoult D, Bittar F. Molecular detection of eukaryotes in a single human stool sample from Senegal. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e40888.
6. Corbo MR, Lanciotti R, Albenzio M, Sinigaglia M. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int J Food Microbiol*. 2001 Sep 19;69(1-2):147–52.
7. Makela P, Leaman D, Sobel JD. Vulvovaginal trichosporonosis. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2003;11(2):131–3.
8. Kontoyiannis DP, Torres HA, Chagua M, Hachem R, Tarrand JJ, Bodey GP, et al. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. *Scand J Infect Dis*. 2004;36(8):564–9.
9. Kemker BJ, Lehmann PF, Lee JW, Walsh TJ. Distinction of deep versus superficial clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigelii* by isoenzymes and restriction fragment length polymorphisms of rDNA generated by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991 Aug;29(8):1677–83.
10. Guého E, Improvisi L, de Hoog GS, Dupont B. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses*. 1994 Feb;37(1-2):3–10.
11. Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Oct;24(4):682–700.
12. Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, Lannes B, Jeung MY, Degot T, et al. Disseminated *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Scedosporium apiospermum* Coinfection after Lung and Liver Transplantation in a Cystic Fibrosis Patient. *J Clin Microbiol*. 2012 Dec;50(12):4168–70.
13. Pappas PG. Opportunistic fungi: a view to the future. *Am J Med Sci*. 2010 Sep;340(3):253–7.

14. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 1;51(5):561–70.
15. Miceli MH, Lee SA. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. *Mycoses*. 2011 Nov;54(6):e666–678.
16. Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, Horn D. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Aug;73(4):293–300.
17. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(1):1–53.
18. Suzuki K, Nakase K, Kyo T, Kohara T, Sugawara Y, Shibazaki T, et al. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Eur J Haematol*. 2010 May;84(5):441–7.
19. Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J Infect*. 2012 Jan;64(1):68–75.
20. 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*. 2009 Jul 1;49(1):e11–17.
21. Watson KC, Kallichurum S. Brain abscess due to *Trichosporon cutaneum*. *J Med Microbiol*. 1970 Feb;3(1):191–3.
22. Girmenia C, Pagano L, Martino B, D’Antonio D, Fanci R, Specchia G, 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*. 2005 Apr;43(4):1818–28.
23. Rodrigues G da S, de Faria RRU, Guazzelli LS, Oliveira F de M, Severo LC. [Nosocomial infection due to *Trichosporon asahii*: clinical revision of 22 cases]. *Rev Iberoam Micol*. 2006 Jun;23(2):85–9.
24. Dudeck MA, Horan TC, Peterson KD, Allen-Bridson K, Morrell G, Pollock DA, et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2010, device-associated module. *Am J Infect Control*. 2011 Dec;39(10):798–816.
25. Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo ASA, Colombo AL. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol*. 2009 Apr;47(4):1074–81.
26. Abdala E, Lopes RI, Chaves CN, Heins-Vaccari EM, Shikanai-Yasuda MA. *Trichosporon asahii* fatal infection in a non-neutropenic patient after orthotopic liver transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2005 Dec;7(3-4):162–5.

27. Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gne, J.; Figueiras, M.J. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgile. BAAR, 1995.
28. Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol*. 2002 May;40(5):1826–30.
29. Guo L-N, Xiao M, Kong F, Chen SC-A, Wang H, Sorrell TC, et al. Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. *J Clin Microbiol*. 2011 Nov;49(11):3805–11.
30. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 1975 ; 47 : 219–225.
31. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1988(20): 151–3.
32. Carbonnelle E, Nassif X. [Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory]. *Med Sci (Paris)*. 2011 Oct;27(10):882–8.
33. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Mar;36(2):380–407.
34. Marklein G, Josten M, Klanke U, Mller E, Horr R, Maier T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*. 2009 Sep;47(9):2912–7.
35. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol*. 2010 Oct;48(10):3482–6.
36. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Sep;17(9):1359–65.
37. Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaid M, Boekhout T, De Baere T, Surmont I, et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 May;31(5):841–8.
38. Cassagne C, Cella A-L, Suchon P, Normand A-C, Ranque S, Piarroux R. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med Mycol*. 2013 May;51(4):371–7.

39. Sendid B, Ducoroy P, François N, Lucchi G, Spinali S, Vagner O, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. *Med Mycol*. 2013 Jan;51(1):25–32.
40. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis*. 2006 Jul 1;43(1):25–31.
41. Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of Rapid Organism Identification via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Combined With Antimicrobial Stewardship Team Intervention in Adult Patients With Bacteremia and Candidemia. *Clin Infect Dis*. 2013 Nov;57(9):1237–45.
42. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Mar 1;48(5):503–35.
43. 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*. 2009 Jul 1;49(1):e11–17.
44. Normand A-C, Cassagne C, Ranque S, L'ollivier C, Fourquet P, Roesems S, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol*. 2013;13:76.
45. Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28425.
46. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013 Mar;51(3):828–34.
47. Machen A, Kobayashi M, Connelly MR, Wang YFW. Comparison of heat inactivation and cell disruption protocols for identification of mycobacteria from solid culture media by use of vitek matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013 Dec;51(12):4226–9.
48. Moretti-Branchini ML, Fukushima K, Schreiber AZ, Nishimura K, Papaioordanou PM, Trabasso P, et al. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001 Mar;39(3):161–4.
49. Rodriguez-Tudela JL, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cano V, Tapia C, Perkins A, et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4026–34.

50. Xia Z, Yang R, Wang W, Cong L. Genotyping and antifungal drug susceptibility of *Trichosporon asahii* isolated from Chinese patients. *Mycopathologia*. 2012 Mar;173(2-3):127–33.
51. Kolecka A, Khayhan K, Groenewald M, Theelen B, Arabatzis M, Velegraki A, et al. Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013 Aug;51(8):2491–500.
52. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Apr 17;109(16):6241–6.
53. Kong F, Chen SCA, Chen X, Sintchenko V, Halliday C, Cai L, et al. Assignment of reference 5'-end 16S rDNA sequences and species-specific sequence polymorphisms improves species identification of *Nocardia*. *Open Microbiol J*. 2009;3:97–105.
54. Gunn SR, Reveles XT, Hamlington JD, Sadkowski LC, Johnson-Pais TL, Jorgensen JH. Use of DNA sequencing analysis to confirm fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a pediatric patient. *J Clin Microbiol*. 2006 Mar;44(3):1175–7.
55. Schmitt I, Crespo A, Divakar PK, Fankhauser JD, Herman-Sackett E, Kalb K, et al. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia*. 2009 Dec;23:35–40.
56. Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol*. 2008 Mar;25(1):S4–12.
57. Galagan JE, Henn MR, Ma L-J, Cuomo CA, Birren B. Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome Res*. 2005 Dec;15(12):1620–31.

APÊNDICE

Projeto aprovado pela CAPPESQ

João Nóbrega de Almeida Júnior

Aplicação da espectrometria de massa MALDI-TOF para Identificação e Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos de cepas de *Trichosporon* spp. responsáveis por Infecção Fúngica Invasiva.

Projeto de Tese para obtenção de título de Doutor em Ciências pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Área de Concentração: Patologia Clínica

Orientação: Professor Doutor Gil Benard

Co-orientação: Doutora Flávia Rossi

Co-orientação exterior: Professora Dominique Mazier

São Paulo

2010

RESUMO

Nas últimas três décadas a incidência de infecções fúngicas invasivas cresceu consideravelmente. Os fatores contribuintes para este fenômeno são o surgimento da AIDS, desenvolvimento de técnicas terapêuticas invasivas em unidades de terapia intensiva, utilização em larga escala de antibióticos de amplo espectro, número crescente de transplantes hematológicos e de órgãos sólidos e conseqüente aumento na população imunodeprimida, surgimento de novos e mais potentes imunossupressores. *Trichosporon* spp. começa a ganhar evidência, principalmente em pacientes onco-hematológicos com cateter venoso central.

Recentes análises da taxonomia do gênero *Trichosporon* através de biologia molecular descrevem 37 espécies, sete delas responsáveis por infecções em humanos: *Trichosporon asahii*, *Trichosporon asteroides*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon mucoides*, *Trichosporon ovoides* e *Trichosporon loubieri*.

A mortalidade de infecções invasivas por *Trichosporon* spp pode chegar a 100% em casos de neutropenia persistente.

A análise dos casos de infecção invasiva por *Trichosporon* spp, com identificação das espécies por técnicas moleculares e posteriormente por espectrometria de massa MALDI-TOF ainda não foi realizado no Brasil, e servirá como base para a aplicação de tal tecnologia na rotina de identificação de fungos da Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP.

A aplicação da tecnologia MALDI-TOF no estudo do fenômeno de resistência aos antifúngicos é incipiente e o grupo francês do “Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et INSERM/UPMC UMR S 945” do Centro Hospitalar Pitié-Salpêtrière é pioneiro. A comparação entre as concentrações inibitórias mínimas dos antifúngicos e as concentrações mínimas de antifúngicos que produzem alteração do perfil de espectrometria para os isolados de *Trichosporon* será realizada em parceria ao grupo francês e é inédito na literatura. As informações geradas poderão ser utilizadas no campo da micologia como uma nova metodologia de teste de suscetibilidade aos antifúngicos não apenas para o gênero *Trichosporon*. A utilização de isolados de infecções invasivas trará maior relevância aos achados obtidos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Revisão de Literatura:

Nas últimas três décadas a incidência de infecções fúngicas invasivas cresceu consideravelmente. Os fatores contribuintes para este fenômeno são o surgimento da AIDS, desenvolvimento de técnicas terapêuticas invasivas em unidades de terapia intensiva, utilização em larga escala de antibióticos de amplo espectro, número crescente de transplantes hematológicos e de órgãos sólidos e conseqüente aumento na população imunodeprimida, surgimento de novos e mais potentes imunossupressores (1, 2, 3).

Entre os fungos leveduriformes, *Candida* spp é certamente o gênero responsável pela maioria destas infecções. *Trichosporon* spp começa a ganhar evidência, principalmente em pacientes oncohematológicos com cateter venoso central (4).

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 de corpo e cabelos dos pacientes (5).

Este gênero é representado por leveduras anamórficas, cuja fase sexuada não é conhecida, e são classificadas como basidiomicetos devido à composição de carboidratos da parede celular (presença de xilose) e relação guanina-citosina de 57-60% (6). O gênero *Trichosporon* caracteriza-se por formar artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas hialinas; algumas espécies possuem outras estruturas morfológicas que permitem diferenciá-las das demais, tais como os apressórios, macroconídios ou conidiação meristemática (5).

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 superficial cerebriforme e radial. As espécies deste gênero são capazes de assimilar diferentes fontes de carboidratos, além de degradar a uréia (5).

O gênero *Trichosporon* é amplamente distribuído em regiões de clima tropical e temperado. Na natureza, são geralmente isoladas de substratos, solo, água e madeira

em decomposição, mas podem, ocasionalmente, constituir flora da pele, das unhas, da mucosa, do trato respiratório e digestivo (5,7).

A primeira descrição de um isolado de *Trichosporon* foi em 1867 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* (6). Posteriormente, em 1890, Behrend descreveu em detalhes o fungo causador de piedra branca na barba de um homem e denominou *T. ovoides*. Em 1902, Vuillemin considerou todas as espécies de *Trichosporon* como *T. beigelli* (6). Recentes análises da taxonomia do gênero *Trichosporon* através de biologia molecular descrevem 37 espécies, sete delas responsáveis por infecções em humanos: *Trichosporon asahii*, *Trichosporon asteroides*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon mucoides*, *Trichosporon ovoides* e *Trichosporon loubieri* (6,7).

Infecções superficiais, da pele, unhas e cabelos, por *Trichosporon* spp são as mais comuns. Porém na última década são crescentes os relatos de infecção invasiva, principalmente em pacientes neutropênicos. Nesta população, a mortalidade é de 80% e pode chegar a 100% em casos de neutropenia persistente (8, 9, 10).

Ruan e colaboradores ao estudarem os casos de tricosporonose invasiva, encontraram que a maioria das infecções (76%) foram causadas pela espécie *T. asahii*, que 95% dos pacientes tinham recebido antibióticos antes da internação, 90% dos pacientes tinham cateter venoso central (CVC) e que 58% tinham neoplasia maligna (11).

A identificação fenotípica das espécies de *Trichosporon* através de metodologias convencionais como API 32 ID® (Biomérieux, França), VITEK 2® (Biomérieux, França) tem limitações e o sequenciamento da região IGS-1 do DNA ribossômico é necessário para realizar a especiação (11,12). Porém a metodologia molecular é trabalhosa e não é compatível com laboratórios de rotina. Alternativa à metodologia molecular é a espectrometria de massa através da Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser (MALDI-TOF) que é capaz de identificar patógenos com precisão, incluindo leveduras, em 90 minutos à partir de uma simples colônia (13). Marklein e colaboradores ao estudarem a identificação de 267 leveduras por MALDI-TOF mostrou que todas cepas tiveram gênero e espécie caracterizados após inclusão dos espectros de isolados mais raros no banco de dados do aparelho, como *Candida norvegensis*, *Candida rugosa*, *Candida dubliniensis* e *Candida ciferrii* (13).

Para estabelecer o perfil de sensibilidade aos antifúngicos de tais patógenos são necessários critérios interpretativos que ainda não foram bem estabelecidos na literatura. Porém há estudos que descrevem a atividade *in vitro* dos diferentes antifúngicos contra espécies do gênero, e, em geral, são descritas baixas concentrações inibitórias mínimas (CIM) para os azólicos, elevadas para anfotericina e 5-flucitosina. As equinocândidas são inativas nos testes de suscetibilidade (11,14). Chagas-Neto e colaboradores ao estudarem o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de cepas de *Trichosporon spp* responsáveis por infecções de corrente sanguínea em cinco hospitais de São Paulo encontraram que 47% dos isolados de *T. asahii* apresentaram CIM igual ou superior a 2ug/ml para anfotericina. Enquanto a suscetibilidade à anfotericina parece ser espécie dependente, no mesmo estudo as espécies apresentaram CIM igual ou inferior a 0,06 ug/ml para voriconazol (11).

Pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), as concentrações inibitórias mínimas para os azólicos são definidos visualmente no ponto onde há redução proeminente do crescimento da amostra em relação ao controle após 48 horas de incubação. Esta redução de crescimento visual tem correlação com a inibição do crescimento em 50%. O método é reprodutível mas laborioso, exige intervalo de tempo de incubação, e a leitura da inibição do crescimento fúngico subjetiva pode sofrer variações de interpretação. Estas limitações tornam necessário o desenvolvimento de novas tecnologias, com menor tempo de análise e com objetivação da interpretação.

Marinach e colaboradores do laboratório de pesquisa INSERM, UMRS 945 de Paris, hipotetizaram que as células fúngicas frente à exposição aos antifúngicos poderiam apresentar alterações em sua constituição protéica e que se estas modificações pudessem ser detectadas de maneira objetiva e reprodutível, elas poderiam ser exploradas para o desenvolvimento de nova geração de testes de sensibilidade aos antifúngicos. Então o grupo de cientistas analisou as alterações dos espectros de massa por MALDI-TOF de cepas de *Candida albicans* frente à exposição a diferentes concentrações de fluconazol e estabeleceu a concentração mínima de alteração de perfil (CMAP) (Minimal Profile Change Concentration-MPCC). Entre 17 isolados de *Candida albicans* com diferentes perfis de sensibilidade e mecanismos de resistência previamente identificados, a concordância entre as CMIs e as CMAPs foi de 94% com ± 1 diluição e de 100% com ± 2 diluições (15).

1.2.Importância.

O complexo HC-FMUPP é um hospital público, universitário e de nível terciário, que engloba: Instituto do coração (INCOR), Instituto de criança (ICR), Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT), Instituto de Psiquiatria (IPQ), Instituto Central (IHC), Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Prédio dos Ambulatórios (PAMB) onde se localiza os ambulatórios de diferentes especialidades e hospital dia. A microbiologia atende a todos os hospitais do complexo.

A análise dos casos de infecção invasiva por *Trichosporon* spp, com identificação das espécies por técnicas moleculares e determinação do perfil de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas, ainda não foi realizado no complexo HC-FMUSP, e são poucos os trabalhos descritos no Brasil e na literatura mundial (11,12).

A utilização da tecnologia MALDI-TOF para identificação das cepas de *Trichosporon* servirá de base para a implementação da tecnologia no Serviço de Microbiologia, Setor de Micologia, da Divisão de Laboratório Central do complexo HC-FMUSP, e acrescentará esta nova ferramenta para a identificação de fungos responsáveis por infecções fúngicas invasivas. O estudo da alteração do perfil de espectrometria de massa frente aos antifúngicos poderá servir como base para futuras pesquisas desta inovadora metodologia de antifungograma.

1.3.Objetivos

1.3.1. Principal

Caracterizar os pacientes com infecção invasiva por *Trichosporon* spp, identificar as espécies envolvidas por biologia molecular e posteriormente padronizar a especiação por espectrometria de massa MALDI-TOF.

1.3.2. Secundário

Comparar as concentrações inibitórias mínimas obtidas por microdiluição às concentrações mínimas de alteração de perfil obtidas por espectrometria de massa.

2. MÉTODOS

2.1. Locais do estudo.

O trabalho será uma parceria entre o Serviço de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do complexo HC-FMUSP, Instituto de Medicina Tropical da FMUSP-LIM 56 e Laboratório INSERM, UMRS 945 de Paris.

2.2. Desenho do estudo.

O estudo realizado será descritivo, retrospectivo, no qual serão avaliados os casos de infecção invasiva por *Trichosporon* spp identificados em diferentes materiais estéreis. Também serão incluídas cepas isoladas de materiais contaminados e que não foram responsáveis por infecção.

Todas serão submetidas inicialmente à identificação por biologia molecular e teste de suscetibilidade aos antifúngicos por microdiluição em caldo.

Posteriormente as cepas serão estudas por espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação e para teste de sensibilidade aos antifúngicos.

2.3. Levantamento dos casos

O levantamento dos pacientes com cultura positiva em sítios estéreis para *Trichosporon* spp, no período entre janeiro de 2004 até o mês de novembro de 2006 foi realizado através do banco de dados do sistema de informação laboratorial – HCLAB. Nos anos posteriores os casos de serão identificados através do sistema informatizado de gerenciamento hospitalar (SIGH). Posteriormente todos os dados obtidos serão comparados com o cadastro do banco de cepas do setor de Micologia, para avaliar as cepas disponíveis para análise. Em seguida será realizado o levantamento dos prontuários para correlacionar as culturas com dados clínicos e caracterizar ou não infecção invasiva por *Trichosporon* spp conforme descrito em item posterior deste projeto.

2.4. Definições e variáveis de interesse.

Infecção invasiva por *Trichosporon* spp. será definida de acordo com definições estabelecidas previamente (16).

Para os casos de infecção invasiva serão avaliadas as seguintes características variáveis:

2.4.1. Variáveis demográficas Categóricas

- Sexo.
- Local de internação.

2.4.2. Variáveis demográficas Numéricas Contínuas

- Tempo de internação

- Idade

2.4.3 Variáveis clínicas categóricas

- Aids
- Doença oncohematológica
- Tumor de órgão sólido
- Transplante de medula óssea autólogo
- Transplante de medula óssea alogênico
- Transplante de órgão sólido
- Doença reumatológica
- Prematuridade
- Doença de sistema nervoso central
- Hepatopatias
- Diabetes mellitus
- Doença renal
- Hipertensão arterial
- Insuficiência renal
- Neutropenia
- Mucosite

2.4.4. Variáveis clínicas numéricas contínuas

- Duração neutropenia
- Contagem de Neutrófilos em sangue periférico na data da infecção
- Escore de gravidade APACHE II nas primeiras 24 horas
- Em caso de AIDS, contagem de linfócitos CD4

2.4.5. Variáveis categóricas relacionadas a procedimentos invasivos.

- Sonda nasogástrica nos 15 dias que antecederam a infecção.
- Cateter venoso central nos 15 dias que antecederam a infecção.
- Hemodiálise nos 15 dias que antecederam a infecção.
- Ventilação mecânica nos 15 dias que antecederam a infecção.
- Sonda vesical de demora nos 15 dias que antecederam a infecção.

2.4.6. Variáveis categóricas relacionadas à terapêutica

- Uso de antibioticoterapia nos 15 dias que antecederam a infecção.
- Uso de corticóides nos 15 dias que antecederam a infecção.
- Uso de quimioterápicos nos 15 dias que antecederam a infecção.
- Uso de antifúngicos nos 15 dias que antecederam a infecção.

2.5. Microbiologia.

2.5.1. Processamento das amostras e identificação dos isolados.

Todas as culturas coletadas a critério clínico serão processadas de acordo com a rotina do laboratório de microbiologia. As hemoculturas são processadas em sistema automatizado Bactec 9240 TM (Becton Dickinson, EUA) utilizando-se os frascos Bactec Plus + Aerobic/F TM, Plus + Anaerobic/F TM e PEDS-Plus/F TM. Os balões coletados são incubados a 35 ° C por 5 dias de acordo com protocolo. Posteriormente, todos os frascos positivos são submetidos a coloração de Gram e semeados concomitante em ágar sangue (Oxoid, EUA), ágar chocolate (Oxoid, EUA) ágar MacConkey (Oxoid, EUA). A observação de leveduras à microscopia é sucedida de semeadura em meios específicos para fungos, a saber: ágar Sabouraud (Oxoid, EUA) e/ou meio cromogênico para espécies de *Candida* (CHROMagar Microbiology, EUA). Todos os materiais de sítios estéreis, quando volume maior que 1 mL, são centrifugados e a cultura realizada apenas com sedimento. Para amostras de líquido a semeadura inicial é realizada em ágar sabouraud dextrose, outros líquidos nobres em meio ágar sabouraud dextrose e SABHI modificado, que consiste em um meio com base de sabouraud dextrose acrescido de vancomicina e ciprofloxacino nas concentrações de 6 µg/mL e 20 µg/mL respectivamente, e os materiais de trato respiratório em ágar SABHI modificado e Mycosel, que consiste de meio base sabouraud dextrose com ciclohexemida na concentração de 0,04%. Quando evidenciado presença de leveduras, uma triagem inicial é realizada com tubo germinativo, que quando positivo denota a presença de *C. albicans*, no caso do teste tubo germinativo ser negativo as leveduras são identificadas através do sistema API 20C AUX TM (BioMerieux, França). Após identificação, os isolados são armazenados em banco de cepas a -80° C, em caldo "Brain Heart Infusion" - BHI (Oxoid, EUA) com 2% de ágar (BBL, EUA) e 40% de glicerol (Nuclear, Brasil), para posterior avaliação do perfil de suscetibilidade e caracterização genotípica das espécies.

2.5.2. Atividade in vitro dos antifúngicos

Todas as cepas estocadas durante o período do estudo serão repicadas em ágar sabouraud dextrose (Oxoid, EUA) e incubadas por 48 horas a 30° C para verificação de viabilidade e pureza. O teste de suscetibilidade aos antifúngicos será realizado através da Microdiluição Sensititre YeastOne Y8® - (Trek, UK) e Microdiluição convencional para as seguintes drogas: anfotericina B, caspofungina, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol.

2.5.3. Microdiluição Sensititre YeastOne Y8®

A microdiluição Sensititre constitui-se de um painel de microdiluição em caldo no qual as placas de microtitulação contêm um indicador colorimétrico de crescimento denominado azul de alamar juntamente com antifúngicos liofilizados em diluições seriadas em (log2). As drogas e contidas nesse painel são: (A) Posaconazol (0,008-8 µg/mL); (B) Anfotericina B (0,008-16 µg/mL); (C) Fluconazol (0,125-256 µg/mL); (D) Itraconazol (0,008-16 µg/mL); (E) Cetoconazol (0,008-16 µg/mL); (F) 5-Flucitosina (0,03-64 µg/mL); (G) Voriconazol (0,008-16 µg/mL); e (H) Caspofungina (0,008-16 µg/mL). O procedimento será realizado de acordo com as recomendações do fabricante: cepas puras e viáveis com crescimento de 24 horas em ágar Sabouraud serão suspensas em 5 mL de água destilada até a obtenção do padrão 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a um inóculo de 1×10^7 a 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Esse padrão será ajustado através da utilização de um turbidímetro (Hach Company, EUA). Em seguida, 20 µL dessa suspensão será adicionada em 11 mL do caldo YeastOne (Trek, UK) composto de meio RPMI 1640, tamponado com ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS). Posteriormente, o conteúdo dessa suspensão será dispensado em caneleta estéril e com o auxílio de uma micropipeta de 12 canais, 100 µL dessa solução será transferida para os poços da placa de microdiluição, sendo que o inóculo final obtido corresponde a uma concentração de 1,5 a 5×10^3 células /mL. Em seguida, os painéis serão incubados a 35° C e analisados após 24 horas. Para os casos em que não ocorrer crescimento da cepa no poço controle positivo, a leitura dos testes acontecerá após 48 ou 72 horas de incubação.

O MIC (µg/mL) será determinado na menor concentração do antifúngico que inibiu o crescimento do microrganismo detectado visualmente através da mudança da cor rosa ou púrpura para a cor azul. A leitura dos painéis será realizada por dois técnicos previamente treinados, de forma independente, quando ocorrer discrepâncias maiores que duas diluições, os testes serão repetidos.

2.5.4. Microdiluição em caldo convencional

Teste de sensibilidade aos antifúngicos por microdiluição em caldo será realizado de acordo com recomendações do CLSI, documento M27-A2 (17). As drogas antifúngicas testadas serão anfoterina, fluconazol, itraconazol, voriconazol (Sigma, EUA).

Para preparo das soluções-mãe, as drogas serão diluídas em água (fluconazol) ou dimetil sulfoxido (anfotericina, voriconazol, itraconazol) em concentrações de 10 a 100 vezes maiores que a concentração desejada e armazenadas a -70C por período máximo de seis meses.

A concentração desejada da droga no preparo da solução-mãe foi obtida através da seguinte fórmula:

$$\text{Volume (ml)} = \frac{\text{potência antifúngico (ug/mg)} \times \text{peso (mg)}}{\text{Concentração desejada(ug/mg)}}$$

Microplacas de 96 orifícios serão esterilizadas e preparadas para cada antifúngico de acordo com recomendações do CLSI, documento M27-A2. Uma solução de trabalho será obtida a partir da solução-mãe (diluição 1:5), com diluições seriadas das drogas em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA) estéril e tamponado com ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS), preparadas para atingir uma concentração final duas vezes superior à concentração final desejada para o teste de sensibilidade. Aliquotas de 100ul das concentrações finais obtidas serão dispensadas nos orifícios das colunas 2 a 11 das placas, de tal forma que a coluna dois terá a concentração mais alta e a coluna 11 a mais baixa para o antifúngico. As concentrações obtidas nos orifícios serão de 64-0,125ug/ml para fluconazol, 8-0,016ug/ml para itraconazol, voriconazol e anfotericina B. As colunas 1 e 12 serão os controles de crescimento e esterilidade, respectivamente.

O Inóculo será preparado de acordo com as recomendações do CLSI, documento M27-A2. As cepas serão repicadas em ágar Sabouraud e incubadas por 24-48 horas a 35C para garantir pureza e viabilidade. Aproximadamente 5 colônias de 1mm serão suspensas em solução salina estéril 0,85%, e serão agitadas vigorosamente. A densidade ótica será ajustada para 0,5 na escala de MacFarland e determinada por turbidímetro (Hach Company, EUA). A concentração do inóculo será de $1,5 \times 10^6$ células de leveduras por ml. A seguir será realizada diluição de 1:50 seguida de 1:20 em

meio RPMI 1640 tamponado com MOPS e sem bicarbonato e com L-glutamina (Sigma, EUA), obtendo-se um inóculo $1,5 \times 10^3$ células de leveduras por ml. Depois serão adicionados 100ul do inóculo nas fileiras de A a F das colunas de 2 a 11 com diferentes concentrações de antifúngicos. As fileiras G e H serão reservadas para controle de qualidade com cepas padrão, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258, de acordo com recomendações do CLSI, documento M27-A2 (17).

2.5.5. Identificação molecular de gênero e espécies de *Trichosporon* spp.

2.5.5.1. Extração do DNA

Para extração do DNA, as culturas das leveduras serão semeadas em meio de ágar extrato de levedura peptona dextrose (YPED) por 16 horas a 30 °C sobre agitação de 200 rpm misturando por 48 horas. 15 mL dessas células recuperadas, serão lavadas uma vez com água fria e posteriormente incubadas por 4 horas com tampão uréia [uréia - 8 M, NaCl - 0.5 M, Tris - 20 mM, EDTA - 20 mM, SDS 2% (BDH, UK), em pH 8] a temperatura ambiente sobre agitação de 60 rpm, em seguida esta mistura será centrifugada por 2 min a $4000 \times g$. O pellet será resuspendido em 400 µl de tampão Tris (0.5% w/v SDS, 0.5% w/v Sarkosyl in TE, pH 7.5) e 400 µl de fenol - cloroformio (1:1, pH 8.0), em seguida 400 µl dessa suspensão serão separados a essa mistura serão adicionadas miçangas de 2 µm, lavadas anteriormente com ácido. Centrifugue a 2.500 rpm por três vezes com intervalo de três minutos a 4 ° C. Para a remoção do RNA a amostra acima será tratada com RNase A por uma hora a 37 °C. A concentração o pureza do DNA será determinada pela densidade óptica de 260nm em uma razão de densidade óptica de 260/280nm respectivamente.

2.5.5.2 PCR e sequenciamento da região IGS1 para identificação de espécie.

Para confirmar a identificação do gênero um serão utilizados os primers, TRF (5'-AGAGGCCTACCATGGTATCA-3') e TRR (5'-TAAGACCCAATAGAGCCCTA-3'). As amostras serão amplificadas em termociclador e os seguintes parâmetros serão utilizados: um ciclo inicial a 94 °C por 3 minutos, seguidos por 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Para a identificação acurada das espécies de *Trichosporon* spp. a região IGS1 será amplificada por PCR, usando os seguintes primers 26F (5'- ATCCTT TGCAGACGA CTTGA-3'), 5SR (5'- AGC TTG ACT TCG CAG ATC GG - 3') e 2x PCR Master Mix (PROMEGA). O PCR será realizado com um ciclo inicial a 94 °C por 5 minutos,

seguidos por 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, um minuto a 57 °C e 2 minutos a 72 °C e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR serão seqüenciados usando o método do dideoxinucleotídeo. As seqüências de nucleotídeos serão submetidas para análise BLAST no site NCBI, para identificação das espécies.

2.5.6. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF.

As cepas serão incubadas 48 horas a 30°C em ágar Sabouraud e cinco colônias serão transferidas a tubo de extração 1.5 ml (Eppendorf, Alemanha) através de alça bacteriológica. Após agitação rigorosa com 0.3 ml de água destilada, 0,9 ml de etanol será adicionado à cada amostra e então centrifugados a 20.000 g por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante o sedimento será secado em ar ambiente. 10 ul do sedimento serão misturados com 50 ul de ácido fórmico (70%), e volume igual de acetonitrila sera adicionada à amostra. A mistura então será novamente centrifugada a 20.000 g por 2 minutos e 1 ul do sobrenadante sera adicionado na placa de aço MALDI, que secará em ar ambiente. Em sequência serão adicionados 2 ul da matrix (ácido ciano-4-hidróxido-cinnamico em ácido acetonitrila-2,5% trifluoroacético a 50%), que secarão e mar ambiente. A análise de espectrometria de masse por MALDI-TOF será realizada pelo espectofotômetro Microflex LT (Bruker, Alemanha). Os espectros gerados serão gravados no modo linear positive em frequência de 20Hz com amplitude de massa entre 2.000 a 20.000 Da. Os parâmetros do aparelho serão ajustados em fonte de íon 1 a 20kV, fonte de íon 2 a 18.5kV, lentes a 8.5kV, extração de íon pulsátil de 250 ns, e sem disparo para o espectofotômetro Microflex LT, e IS1 a 19kV, IS2 a 16.5kV, lentes a 8kV, PIE de 200ns. Para cada espectro gerado, 240 feixes de laser em 30 posições diferentes serão coletadas e analisadas. O espectro será externamente calibrado através da utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli*. Programa FlexAnalysis (versão 2.0) (Bruker, Alemanha) foi utilizado para inspeção manual do espectro de massa e comparação com a base de dados. A concordância entre os espectros do banco de dados e dos espectros gerados serão expressos em valores de log de 0 a 3. Valores de 1.7 indicam relação de gênero e 2.0 indicam relação de espécie.

2.5.7. Cálculo das Concentrações Mínimas de Alteração de Perfil (CMAP)

De acordo com o protocolo estabelecido por Marinach e colaboradores cada isolado terá o espectro de massa extraído frente a diferentes concentrações de antifúngicos (0.125 mg/ml a 128 mg/ml) e sem antifúngico. Em resumo, as discrepâncias entre as espectrometrias de massa obtidas entre a máxima concentração de

antifúngico e ausência de antifúngico serão definidas. Cada espectrometria de massa gerada após a exposição a concentrações intermediárias de antifúngicos será comparada às espectrometrias de massa dos extremos de exposição ao antifúngico (sem antifúngico e maior concentração do antifúngico) e serão classificadas como “próximas à concentração máxima do antifúngico” ou “à ausência de antifúngico”. A menor concentração de antifúngico que produzir um espectro de massa “próxima à concentração máxima do antifúngico” será determinada como CMAP (15).

2.6. Análise dos dados

Para a coleta de dados das variáveis clínicas e laboratoriais será utilizada uma ficha padrão e os dados posteriormente serão inseridos em planilha de Excel (Microsoft, 2007). Para analisar possíveis fatores de risco para infecção por *Trischoporon* spp, será calculado o teste do qui-quadrado ou teste Fisher para variáveis categóricas utilizando o software Epi Info (CDC, 2004). As variáveis numéricas serão analisadas por teste *t* através do software Epi Info (CDC, 2004). Resultado estatisticamente significativo será considerado quando $p < 0,05$. Com relação ao perfil de suscetibilidade serão calculados MIC₅₀, MIC₉₀, range dos MICs e média dos MICs utilizando o programa Whonet versão 5.4. Será realizada correlação entre as espécies identificadas pela biologia molecular e por MALDI-TOF através de porcentagem. A correlação percentual entre as CIMs e as CMAP será realizada entre valores $\pm 1\log$ e $\pm 2\log$ s.

3. ANÁLISE DE RISCOS

Não haverá riscos aos pacientes. As cepas estudadas serão aquelas isoladas na rotina da Seção de Microbiologia de diferentes materiais biológicos coletados e serão realizados testes “in vitro”.

O estudo envolverá a semeadura e manipulação de cepas de fungos pelos profissionais do Serviço de Microbiologia. São utilizadas luvas descartáveis em cada manipulação. A eventual exposição cutânea do profissional aos fungos não produz riscos à saúde do mesmo, já que imediatamente a região contaminada é higienizada com água e sabão.

O descarte dos resíduos é realizado em recipientes rígidos denominados “Clean-Box II” que são lacrados e posteriormente descaracterizados de acordo com as regras da instituição.

4. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO

A partir de março de 2011 serão realizados o estudo do perfil de sensibilidade aos antifúngicos e a análise molecular das cepas, com perspectiva de finalização dos trabalhos em outubro de 2011.

Análise dos dados dos prontuários será executada de março de 2011 a maio de 2011.

A partir de janeiro de 2012 as cepas serão estudadas no Laboratório INSERM, UMRS 945 de Paris.

5. ORIGEM DOS RECURSOS FINANCEIROS

Os recursos para execução do projeto serão devidamente solicitados à FAPESP.

O montante calculado necessário para cumprir todas as etapas do estudo será de cerca de R\$ 40.000,00.

Para complementação da pesquisa no Laboratório INSERM, UMRS 945 de Paris, será solicitada bolsa de PDEE da CAPES.

6. PROCEDIMENTOS APÓS A REALIZAÇÃO DA PESQUISA E COMPROMETIMENTO COM A INSTITUIÇÃO

Os dados revelados pelos trabalhos serão publicados em revista indexada internacional.

As cepas utilizadas no estudo serão adequadamente armazenadas em freezer a menos 70°C por tempo indeterminado.

Exames fenotípicos e moleculares serão fotografados e armazenados em banco de dados da instituição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133–163.
2. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 531–540.
3. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 781–805.
4. Walsh, T. J., A. Groll, J. Hiemenz, R. Fleming, E. Roilides, and E. Anaissie. 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 10(Suppl. 1):48–66.
5. Chagas-Neto TC, Chaves GM, Colombo AL. Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia* 2008; 166:121-132.
6. Gueho E, Improvisi L, de Hoog GS, Dupont B. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses* 1994; 37:3–10
7. Nakagawa T, Nakashima K, Takaiwa T, Negayama K. *Trichosporon cutaneum* (*Trichosporon asahii*) infection mimicking hand eczema in a patient with leukemia. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 929-931.
8. Marty FM, Barouch DH, Coakley EP, Baden LR. Disseminated trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5317-5320.
9. Rodrigues Gda S, de Faria RR, Guazzelli LS, Oliveira Fde M, Severo LC. Nosocomial infection due to *Trichosporon asahii*: clinical revision of 22 cases [in Spanish]. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23:85–9.
10. Bassetti M, Bisio F, Di Biagio A, Pierri I, Balocco M, Soro O, Cruciani M, Bassetti D. *Trichosporon asahii* infection treated with caspofungin combined with liposomal amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 575-577.
11. Ruan SY, Chien JY, Hsueh PR. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 2009;49:11-7.
12. Sugita, T. et al. Sequence analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* species. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002: 1826-30.
13. Marklein, G. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:2912-7.
14. Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo AS, Colombo AL. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on

the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:1074-81.

15. Marinach, C. et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* 2009: 4627–4631.

16. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008:1813–21.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A2. 3 ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.

APROVAÇÃO

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 15/02/2011, **APROVOU ad-referendum** o Protocolo de Pesquisa nº **0044/11**, intitulado: "**Aplicação da espectrometria de massa MALDI-TOF para Identificação e Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos de cepas de Trichosporon spp. responsáveis por Infecção Fúngica Invasiva.**" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

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: **Gil Benard**

Pesquisador (a) Executante: **João Nóbrega de Almeida Júnior**

CAPPesq, 15 de Fevereiro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO

Coordenador

**Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq**