

**Raquel Maria Lima Lemes**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE  
*TRICHOSPORON* SPP. IMPLICADOS EM INFECÇÕES EM  
HUMANOS: UM PATÓGENO EMERGENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração, Microbiologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Aparecida de Resende.**

Prof<sup>a</sup>. Titular de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, contando com o apoio financeiro da Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**

Belo Horizonte – Minas Gerais

**2004**

Lemes, Raquel Maria Lima

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Trichosporon* spp. implicados em infecções em humanos: um patógeno emergente / Raquel Maria Lima Lemes.** – Belo Horizonte. 2004. 156p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. – UFMG.

1. *Trichosporon* spp. 2. Infecções sistêmicas. 3. Perfil de susceptibilidade. 4. Randomly Amplified Polymorphic DNA. 5. Fenotipagem.

## **HOMENAGENS ESPECIAIS**

*“Este trabalho foi executado em extrema variação geográfica temporal,  
com creditação oscilante entre o ápice e o abisso,  
dividindo espaço o tempo todo com uma solidão  
imensurável e um tumulto aterrorizante.  
E mesmo assim, chegou ao término!  
Havia por detrás um Deus e uma família.”*

*E é à Deus e à essa família que agradeço:*

*À Deus, pelos momentos difíceis que me ensinaram a confiar e me fizeram ponderar sobre todas as coisas;*

*À minha querida mãe, cujo carinho e amor, a mim dispensados, amenizam todos os momentos doídos;*

*Ao meu querido pai, pela preocupação e carinho demonstrados ao longo das viagens;*

*Aos meus filhos, Vicente, Lucas e Raphael, pelos deliciosos abraços apertados, pelos beijos, pelos cafunés, pelos risos e pela vida que vocês derramam sobre mim.*

*À todos vocês, meus grandes amores, meu muito obrigada por participarem dessa jornada, seja me amando ou incentivando. E fica aqui minha promessa de tentar nunca me esquecer do Epitáfio (Devia ter amado mais, trabalho menos...).*

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida de Resende, pela credibilidade e incentivo, apoio, amizade e compreensão, que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho, e tornaram menos árdua a distância familiar.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erna Gessien Kroon, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Microbiologia.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo, do LEMI da UNIFESP, cuja colaboração foi imprescindível para a execução e enriquecimento deste trabalho.

Às amigas Márcia Melhem e Sandra Brasil, do Instituto Adolfo Lutz, pelo incentivo e colaboração na formação do banco de leveduras empregadas neste trabalho.

Ao Prof. Murilo Gomes Oliveira e sua equipe do Laboratório de Microbiologia do HU da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela valiosa colaboração no banco de leveduras empregadas na parte experimental deste estudo.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Júnia Hamdan, Dr<sup>a</sup>. Patrícia Cisalpino e Dr. Carlos Rosa, pela disponibilidade e ensinamentos valiosos compartilhados.

Aos demais professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Microbiologia do ICB.

À querida amiga Conceição, que esteve sempre presente nos momentos mais difíceis desta empreitada, me estimulando e contagiando com sua alegria de viver.

Às queridas amigas Rosângela Barros, Neuza e Edméa, pelo apoio, mesmo de longe.

À Bete, Walquíria e Geraldo, pelo companheirismo, apoio constante e amizade tão preciosa.

Aos companheiros de jornada do Laboratório de Micologia, Henrique, José Antônio, Érica, Cristiane, Rita Botelho, Suzana, Hyllo, Lidiane, Daniel, Betânia, Eduardo, Rosane, Ety e a todos a quem não me referi, pelo companheirismo e solidariedade e principalmente pela convivência fraterna.

À Bete, ser humano solidário sem a qual a digitação dessa tese não estaria concluída, que se tornou uma amiga inesquecível. Deus lhe pague, amiga! À você também Wal.

À Maria Cristina, secretária do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, pela amizade e atenção durante todo o curso.

Aos colegas da Pós-Graduação, pelo companheirismo e solidariedade.

Ao Dr. João Batista Macuco Janini, meu primeiro mestre, por ser aquele que acreditou que eu atingiria meus maiores objetivos.

À Diretoria e Coordenação do curso de Enfermagem da EEWB, pelo apoio e incentivo.

À Diretoria do HE e Coordenação do curso de Nutrição da FMIt, pelo apoio e incentivo.

À Cidinha do setor de Microbiologia do LAC do HE da FMIt, companheira e amiga, obrigada pela compreensão, colaboração e convívio harmonioso ao longo destes anos. E principalmente pela cooperação em minhas atividades práticas.

À Gilza do setor de Microbiologia do LAC do HE da FMIt, companheira e amiga, obrigada pela paciência e bom humor, fatores que contribuíram para convívio agradável entre nós três nestes anos. Agradeço também seu incentivo e cooperação nas minhas idas e vindas.

## RESUMO

---

Foram analisadas 65 amostras de leveduras, sendo que 39 foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Trichosporon*, pelo método clássico e cinco excluídas pela genotipagem, através do método de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pelo uso de oligonucleotídeos capazes de diferenciar as principais espécies do gênero, pela caracterização da região do ITS. O iniciador OPA2 possibilitou a identificação de 4 espécies (*T. asahii* [26], *T. asteroides* [05], *T. ovoides* [02], e *T. mucooides* [01]). O perfil de susceptibilidade das amostras analisadas foi determinado frente a seis drogas antifúngicas: anfotericina B (Anfo B), 5-flucitosina (5-Fc), fluconazol (Flu), itraconazol (Itra), terbinafina (Terb) e voriconazol (Vor), de acordo com a técnica descrita pelo NCCLS (National Committee for Control Laboratory Standard) e o método E-test. *Trichosporon asahii* e *T. ovoides* apresentaram sensibilidade à 5-flucitosina, *T. mucooides* à Anfo. B e ao Vor, enquanto que *T. asteroides* demonstrou resistência a todos os antifúngicos testados, com exceção do Flu. A CIM (concentração inibitória mínima) para Terb variou de 0,031 - 8,0 µg/mL. Todas as espécies apresentaram resistência ao Itra e sensibilidade ao Flu (CIM<sub>90</sub> 48 horas). A amostra de origem ambiental e as isoladas de micoses superficial (01) e sistêmicas (19) foram sensíveis a Anfo B, 5-Fc e Vor, enquanto que as oriundas de micoses cutâneas (07) e subcutâneas (05) apresentaram resistência à droga poliênica. Todas as amostras apresentaram resistência ao Itra. Com exceção de duas de *T. asahii* (uma isolada de infecção subcutânea e outra de superficial), as demais apresentaram sensibilidade ao Flu. A comparação entre os resultados obtidos pelo método do NCCLS e E-test revelou maiores discrepâncias entre os testes com 5-Fc e Itra. Devido à variabilidade do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos entre as espécies, independente do sítio de isolamento, o RAPD superou o método clássico na identificação de espécies de *Trichosporon*, identificação necessária para auxiliar no direcionamento do tratamento das tricosporonoses.

**Palavras-chave:** *Trichosporon* spp., infecções sistêmicas, perfil de susceptibilidade, RAPD, fenotipagem.

## SUMMARY

---

Sixty-five samples of yeasts were analyzed, and 39 were confirmed as belonging to the genus *Trichosporon*, for the classic method and five excluded by genotyping, through the method of RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) for the oligonucleotides use, capable to differentiate the main species of the genus for the characterization of the area of ITS (Intergenic Space). The primer OPA2 made possible the identification of 4 species (*T. asahii*, *T. asteroides*, *T. ovoides* and *T. mucooides*). The profile of susceptibility of the analyzed samples was tested to six antifungic drugs: amphotericin B (Ampho B), 5-flucitosin (5-Fc), fluconazole (Flu), itraconazoel (Itra), terbinafine (Terb) and voriconazole (Vor), in agreement with the technique described by NCCLS (National Committee for Control Laboratory Standard) and the method E-test. *Trichosporon asahii* and *T. ovoides* presented sensibility at 5-flucitosin, *T. mucooides* to Ampho B and to Vor, while *T. asteroides* demonstrated resistance the all of the tested drugs, except for Flu. MIC (minimum inhibitor concentration) for Terb varied from 0.031 – 8.0 mg/mL. All of the species presented resistance to Itra and sensibility to Flu (MIC<sub>90</sub> 48 hours). The sample of environmental origin and those isolated of superficial and systemic mycoses were sensitive to Ampho B, 5-Fc and Vor, while those originating from of cutaneous and subcutaneous mycoses presented resistance to the polienic drug. All of the samples presented resistance to Itra. Except for two of *T. asahii* (an isolated from subcutaneous infection and another of superficial), the others presented sensibility to Flu. The comparison among the results obtained by the method of NCCLS and E-test revealed larger discrepancies among the tests with 5-Fc and Itra. RAPD overcame the classic method in the identification of species of *Trichosporon*, necessary identification to aid to address to the treatment of the trichosporonosis, due to the variability of the susceptibility profile to the antifungals among the species, independent of the isolation site.

**Word-key:** *Trichosporon* spp., systemic infections, susceptibility profile, RAPD, phenotyping.

## LISTA DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Figura 1</b> - Teste de fermentação da glicose e detecção da enzima ureas .....  | 40     |
| <b>Figura 2</b> - Distribuição das amostras de <i>Trichosporon</i> obtidas de acordo com o material biológico.....  | 42     |
| <b>Figura 3A</b> – Macromorfologia de <i>Trichosporon asahii</i> .....  | 48     |
| <b>Figura 3B</b> – Micromorfologia de <i>Trichosporon asahii</i> .....  | 48     |
| <b>Figura 4A</b> - Macromorfologia de <i>Trichosporon asteroides</i> .....  | 48     |
| <b>Figura 4B</b> - Micromorfologia de <i>Trichosporon asteroides</i> .....  | 48     |
| <b>Figura 5A</b> - Macromorfologia de <i>Trichosporon coremiiforme</i> .....  | 49     |
| <b>Figura 5B</b> - Micromorfologia de <i>Trichosporon coremiiforme</i> .....  | 49     |
| <b>Figura 6A</b> - Macromorfologia de <i>Trichosporon inkin</i> .....   | 49     |
| <b>Figura 6B</b> - Micromorfologia de <i>Trichosporon inkin</i> .....   | 49     |
| <b>Figura 7A</b> - Macromorfologia de <i>Trichosporon mucoides</i> .....  | 50     |
| <b>Figura 7B</b> - Micromorfologia de <i>Trichosporon mucoides</i> .....  | 50     |
| <b>Figura 8A</b> - Macromorfologia de <i>Trichosporon ovoides</i> .....   | 50     |
| <b>Figura 8B</b> - Micromorfologia de <i>Trichosporon ovoides</i> .....   | 50     |
| <b>Figuras 9, 10 e 11</b> – Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com iniciador M2, M3 e B14, respectivamente, em reação de RAPD à 40°C.....       | 52     |
| <b>Figuras 12, 13 e 14</b> - Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com iniciador SOY5, OPA2 e OPA4, respectivamente, em reação de RAPD à 40°C..... | 53     |
| <b>Figuras 15, 16 e 17</b> - Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com iniciador M2, M3 e SOY5, respectivamente, em reação de RAPD à 35°C.....     | 54     |
| <b>Figuras 18, 19 e 20</b> - Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com iniciador OPA4, OPA2 e B14, respectivamente, em reação de RAPD à 40°C.....  | 55     |
| <b>Figura 21</b> - Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com os iniciadores ITS1 e ITS2.....   | 63     |



|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 22</b> - Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras, com os iniciadores ITS1 e ITS2.....          | 64  |
| <b>Figura 23</b> - Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras, com os iniciadores ITS1 e ITS2.....          | 65  |
| <b>Figura 24</b> – Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica RAPD com iniciador OPA2.....                     | 68  |
| <b>Figura 25</b> - Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica RAPD com iniciador OPA2.....                     | 69  |
| <b>Figura 26</b> - Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica RAPD com iniciador OPA2.....                     | 70  |
| <b>Figura 27</b> - Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica RAPD com iniciador OPA2.....                     | 71  |
| <b>Figura 28</b> - Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica RAPD com iniciador OPA2.....                     | 72  |
| <b>Figura 29</b> - Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica RAPD com iniciador OPA2.....                     | 73  |
| <b>Figura 30</b> – Microdiluição em caldo pelo NCCLS com amostras do gênero <i>Trichosporon</i> . Leitura de 48 horas.....                          | 89  |
| <b>Figura 31</b> – Perfil de susceptibilidade realizado através do método E-test, com itraconazol e anfotericina B, em ágar Sabouraud dextrose..... | 103 |

## LISTA DE TABELAS

---

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Tabela 1</b> – Caracterização das amostras de <i>Trichosporon</i> analisadas através das provas de fermentação de glicose e produção de urease.....                                  | 37     |
| <b>Tabela 2</b> – Distribuição das amostras caracterizadas como gênero <i>Trichosporon</i> de acordo com o sítio de isolamento.....   | 41     |
| <b>Tabela 3</b> – Identificação das espécies do gênero <i>Trichosporon</i> , através de auxanograma, microcultivo e colônia gigante.....  | 40     |
| <b>Tabela 4A</b> – Distribuição e tamanho estimado dos pares de bases das amostras CBS de <i>Trichosporon</i> spp. com o oligonucleotídeo OPA2.....                                     | 56     |
| <b>Tabela 4B</b> - Distribuição e tamanho estimado dos pares de bases das amostras CBS de <i>Trichosporon</i> spp. com o oligonucleotídeo OPA4.....                                     | 57     |
| <b>Tabela 4C</b> - Distribuição e tamanho estimado dos pares de bases das amostras CBS de <i>Trichosporon</i> spp. com o oligonucleotídeo B14.....                                      | 58     |
| <b>Tabela 4D</b> - Distribuição e tamanho estimado dos pares de bases das amostras CBS de <i>Trichosporon</i> spp. com o oligonucleotídeo M2.....                                       | 59     |
| <b>Tabela 4E</b> - Distribuição e tamanho estimado dos pares de bases das amostras CBS de <i>Trichosporon</i> spp. com o oligonucleotídeo SOY5.....                                     | 60     |
| <b>Tabela 4F</b> - Distribuição e tamanho estimado dos pares de bases das amostras CBS de <i>Trichosporon</i> spp. com o oligonucleotídeo M3.....                                       | 61     |
| <b>Tabela 5A</b> – Susceptibilidade <i>in vitro</i> à anfotericina B de amostras de <i>Trichosporon</i> spp. da coleção CBS, pelos métodos do NCCLS e E-test (leitura de 48 horas)..... | 76     |
| <b>Tabela 5B</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> à 5-flucitosina de amostras de <i>Trichosporon</i> spp. da coleção CBS, pelos métodos do NCCLS e E-test (leitura de 48 horas).....  | 77     |
| <b>Tabela 5C</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> ao fluconazol de amostras de <i>Trichosporon</i> spp. da coleção CBS, pelos métodos do NCCLS e E-test (leitura de 48 horas).....    | 79     |
| <b>Tabela 5D</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> ao itraconazol de amostras de <i>Trichosporon</i> spp. da coleção CBS, pelos métodos do NCCLS e E-test (leitura de 48 horas).....   | 79     |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 6</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> à terbinafina de amostras de <i>Trichosporon</i> spp. da coleção CBS, pelo método do NCCLS (leitura de 48 horas).....   | 80 |
| <b>Tabela 7</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> ao voriconazol de amostras de <i>Trichosporon</i> spp. da coleção CBS, pelo método do NCCLS (leitura de 48 horas).....  | 81 |
| <b>Tabela 8</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> das amostras de leveduras do gênero <i>Trichosporon</i> frente aos seis antifúngicos testados.....  | 84 |
| <b>Tabela 9A</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de espécies do gênero <i>Trichosporon</i> frente à anfotericina B.....   | 84 |
| <b>Tabela 9B</b> - . Susceptibilidade <i>in vitro</i> de espécies do gênero <i>Trichosporon</i> frente à 5-flucitosina.....  | 85 |
| <b>Tabela 9C</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de espécies do gênero <i>Trichosporon</i> frente ao fluconazol.....  | 85 |
| <b>Tabela 9D</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de espécies do gênero <i>Trichosporon</i> frente à ao itraconazol.....   | 86 |
| <b>Tabela 9E</b> - . Susceptibilidade <i>in vitro</i> de espécies do gênero <i>Trichosporon</i> frente à terbinafina.....  | 86 |
| <b>Tabela 9F</b> - . Susceptibilidade <i>in vitro</i> de espécies do gênero <i>Trichosporon</i> frente ao voriconazol.....   | 87 |
| <b>Tabela 10A</b> - Distribuição dos valores das CIMs de anfotericina B e 5-flucitosina das espécies do gênero <i>Trichosporon</i> .....   | 87 |
| <b>Tabela 10B</b> - Distribuição dos valores das CIMs de fluconazol e itraconazol das das espécies do gênero <i>Trichosporon</i> .....   | 88 |
| <b>Tabela 10C</b> - Distribuição dos valores das CIMs de terbinafina e voriconazol das das espécies do gênero <i>Trichosporon</i> .....  | 88 |
| <b>Tabela 11A</b> – Susceptibilidade/resistência <i>in vitro</i> do gênero <i>Trichosporon</i> , à anfotericina B, determinado pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas)..... | 90 |
| <b>Tabela 11B</b> - Susceptibilidade/resistência <i>in vitro</i> do gênero <i>Trichosporon</i> , à 5-flucitosina, determinado pelo método de microdiluição em caldo, padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas)..... | 91 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 11C</b> - Susceptibilidade/resistência <i>in vitro</i> do gênero <i>Trichosporon</i> , ao fluconazol, determinado pelo método de microdiluição em caldo, padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas).....                         | 92  |
| <b>Tabela 11D</b> - Susceptibilidade/resistência <i>in vitro</i> do gênero <i>Trichosporon</i> , ao itraconazol, determinado pelo método de microdiluição em caldo, padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas).....                        | 93  |
| <b>Tabela 11E</b> - Susceptibilidade/resistência <i>in vitro</i> do gênero <i>Trichosporon</i> , à terbinafina, determinado pelo método de microdiluição em caldo, padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas).....                         | 94  |
| <b>Tabela 11F</b> - Susceptibilidade/resistência <i>in vitro</i> do gênero <i>Trichosporon</i> , ao voriconazol, determinado pelo método de microdiluição em caldo, padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas) .....                       | 95  |
| <b>Tabela 12A</b> – Distribuição de leveduras do gênero <i>Trichosporon</i> sensíveis (S), susceptibilidade dose dependente (S-DD) e resistentes (R) à anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol e itraconazol segundo o NCCLS M27 – A2..... | 96  |
| <b>Tabela 12B</b> - Distribuição de leveduras do gênero <i>Trichosporon</i> sensíveis (S) e resistentes (R) ao voriconazol segundo o NCCLS M27 – A2.....   | 97  |
| <b>Tabela 13A</b> – Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Trichosporon</i> spp. de acordo com o sítio anatômico/material clínico, em relação à anfotericina B (leitura de 48 horas) .....   | 99  |
| <b>Tabela 13B</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Trichosporon</i> spp. de acordo com o sítio anatômico/material clínico, em relação à 5-flucitosina (leitura de 48 horas) .....  | 99  |
| <b>Tabela 13C</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Trichosporon</i> spp. de acordo com o sítio anatômico/material clínico, em relação ao fluconazol (leitura de 48 horas) .....  | 100 |
| <b>Tabela 13D</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Trichosporon</i> spp. de acordo com o sítio de origem e material clínico, em relação ao itraconazol (leitura de 48 horas) .....   | 100 |
| <b>Tabela 13E</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Trichosporon</i> spp. de acordo com o sítio anatômico/material clínico, em relação à terbinafina (leitura de 48 horas) .....  | 101 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 13F</b> - Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Trichosporon</i> spp. de acordo com o sítio anatômico/material clínico, em relação ao voriconazol (leitura de 48 horas) ..... | 101 |
| <b>Tabela 14</b> – Comparação das CIMs obtidas de amostras de <i>Trichosporon</i> spp. pelo método de NCCLS com as do E-test (leitura de 48 horas).....                                  | 102 |

# SUMÁRIO

## Página

|  |            |
|--|------------|
| <b>I - RESUMO.....</b>   | <b>i</b>   |
| <b>II - SUMMARY.....</b>   | <b>ii</b>  |
| <b>III – LISTA DE FIGURAS.....</b>   | <b>iii</b> |
| <b>IV – LISTA DE TABELAS.....</b>  | <b>v</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>  | <b>01</b>  |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>   | <b>05</b>  |
| 2.1. Histórico.....  | 05         |
| 2.2. Características Estruturais do Gênero.....                                    | 06         |
| 2.2.1. <i>Características Taxonômicas</i> .....                                    | 06         |
| 2.2.2. <i>Constituição de Parede</i> .....   | 06         |
| 2.3. Fatores de Predisposição do Hospedeiro e de Virulência do Fungo.....          | 07         |
| 2.4. Características Morfológicas.....   | 08         |
| 2.5. Caracterização fenotípica e genotípica.....                                   | 09         |
| 2.5.1. <i>Genotípica</i> .....   | 09         |
| 2.5.2. <i>Identificação pelo Método Clássico</i> .....                             | 10         |
| 2.5.3. <i>Identificação Presuntiva por Meios Comerciais</i> .....                  | 10         |
| 2.5.4. <i>Métodos de Biologia Molecular</i> .....                                  | 10         |
| 2.6. <i>Trichosporon</i> : um Patógeno Emergente.....                              | 11         |
| 2.7. Características das Principais Espécies Envolvidas em Infecções no Homem..... | 12         |
| 2.7.1. <i>Trichosporon ovoides</i> .....   | 13         |
| 2.7.2. <i>Trichosporon inkin</i> .....   | 13         |
| 2.7.3. <i>Trichosporon asahii</i> .....  | 14         |
| 2.7.4. <i>Trichosporon asteroides</i> .....  | 14         |
| 2.7.5. <i>Trichosporon cutaneum</i> .....  | 15         |
| 2.7.6. <i>Trichosporon mucoides</i> .....  | 15         |
| 2.8. Epidemiologia das Tricosporonoses.....  | 16         |
| 2.9. Perfil de Susceptibilidade de <i>Trichosporon</i> .....                       | 18         |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>   | <b>20</b>  |
| 3.1. Objetivo Geral.....   | 20         |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2. Objetivos Específicos.....   | 20        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>21</b> |
| 4.1. Amostras.....  | 21        |
| 4.2. Manutenção das Amostras.....   | 21        |
| • Relação das amostras obtidas.....   | 21        |
| 4.3. Identificação das Leveduras.....   | 24        |
| 4.3.1. Prova de crescimento a 37°C.....   | 24        |
| 4.3.2. Análise Morfológica.....   | 24        |
| 4.3.2.1. Aspectos macromorfológicos.....  | 24        |
| 4.3.2.2. Aspectos micromorfológicos – Microcultivo.....   | 25        |
| 4.3.3. Análise Bioquímica.....  | 25        |
| 4.3.3.1. Fermentação de Fontes de Carbono (Zimograma).....  | 25        |
| 4.3.3.2. Prova de Assimilação de Fontes de Carbono e de Nitrogênio (Auxanograma).....                               | 25        |
| 4.3.3.3. Detecção da enzima urease.....   | 26        |
| 4.4. Análise do padrão de Susceptibilidade à Antifúngicos.....  | 26        |
| 4.4.1. Antifúngicos.....  | 26        |
| 4.4.1.2. Preparo da solução estoque de antifúngicos.....  | 27        |
| 4.4.2. Meio de Cultivo.....   | 27        |
| 4.4.3. Preparação do inóculo.....   | 27        |
| 4.4.4. Diluição em caldo realizada em placa para microdiluição e em tubos de ensaio para macrodiluição (NCCLS)..... | 28        |
| 4.4.5. Realização do E-test.....  | 29        |
| 4.4.6. Análise dos resultados do teste de susceptibilidade.....   | 30        |
| 4.5. Caracterização genotípica.....   | 32        |
| 4.5.1. Amplificação arbitrária de polimorfismos de DNA.....   | 32        |
| 4.5.1.1. Formação de protoplastos e extração de DNA.....  | 32        |
| 4.5.1.2. Quantificação do DNA.....  | 33        |
| 4.5.1.3. Iniciadores utilizados.....  | 33        |
| 4.5.1.3.1. Concentração dos iniciadores utilizados.....   | 33        |
| 4.5.1.4. Reação em cadeia da polimerase – PCR.....  | 34        |
| 4.5.1.5. Eletroforese de fragmentos de DNA.....   | 34        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.5.1.6. Avaliação da similaridade genética.....  | 36         |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>35</b>  |
| 5.1. Confirmação da identificação do gênero <i>Trichosporon</i> nas amostras analisadas através do método clássico..... | 35         |
| 5.2. Frequência de <i>Trichosporon</i> de acordo com o sítio anatômico de origem.....                                   | 35         |
| 5.3. Identificação das espécies do gênero <i>Trichosporon</i> através do Método Clássico.....                           | 35         |
| 5.4. Seleção dos iniciadores através da temperatura.....  | 51         |
| 5.5. Identificação genotípica do gênero <i>Trichosporon</i> através da região ITS.....                                  | 62         |
| 5.6. Identificação das espécies do gênero <i>Trichosporon</i> através de RAPD com o iniciador OPA2 a 35°C.....          | 66         |
| 5.7. Perfil de susceptibilidade das amostras padrão CBS.....  | 74         |
| 5.8. Perfil de susceptibilidade das amostras analisadas segundo gênero.....   | 82         |
| 5.9. Perfil de susceptibilidade das amostras analisadas segundo espécie.....  | 82         |
| 5.10. Perfil de susceptibilidade das espécies do gênero <i>Trichosporon</i> segundo o sítio de isolamento.....          | 98         |
| 5.11. Comparação das CIM obtidas pelo método de NCCLS com as do E-test.....   | 98         |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>104</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>115</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>117</b> |
| <b>9. ANEXOS.....</b>   | <b>132</b> |



# 1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

---

*Trichosporon* spp. é uma levedura encontrada no solo e conhecida como agente causador de “piedra branca”, uma micose superficial descrita pela primeira vez em 1865 por Beigel. Foi classificada como *Trichosporon beigelli* somente em 1902, por Vuillemin. O gênero *Trichosporon* pertence ao Filo Basidiomycotina, produz urease extracelular e possui antígenos polissacarídeos capsulares comuns à levedura capsulada, *Cryptococcus neoformans*. Soro, plasma e líquido céfalo raquidiano obtidos de pacientes com tricosporonose reagem com antígenos de *C. neoformans* no teste de aglutinação do látex. O gênero *Trichosporon* é saprófita facultativo e várias espécies fazem parte da microbiota oral, gastrointestinal e anorretal de humanos. Proteínas (11%), carboidrato neutro (63%), glucosamina (9%) e ácido glucorônico (13%) constituem a parede da levedura. As colônias de *Trichosporon* podem apresentar ou não aspecto branco-farinoso, mucoso ou seco, com coloração branca ou creme. A micromorfologia revela micélio verdadeiro, pseudo-micélio e artroconídios abundantes. Apressório, sarcina, células gigantes e endoconídios estão presentes somente em algumas espécies. A habilidade de médicos e microbiologistas em reconhecer patógenos oportunistas importantes, dentre eles o gênero *Trichosporon*, associada à sensibilidade dos sistemas de cultura e procedimentos empregados para favorecer o crescimento de leveduras incomuns, resultou no aumento da frequência de isolamento destas leveduras.

A revisão deste gênero foi realizada através da análise de características morfológicas, ultraestruturais, fisiológicas, porcentagem das moléculas de DNA, guanina e citosina, reassociação de DNA/DNA e sequência parcial do 26S rRNA. Dezenove espécies foram caracterizadas, 15 apresentando sistema de coenzimas Q-9 e quatro desenvolvendo sistemas de coenzima Q-10. As dezenove espécies apresentaram grande homologia genética na análise da sequência de rRNA com exceção de *T. pullulans*. Seis são as espécies mais comumente envolvidas em infecções em humanos: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides*.

Nas últimas décadas houve grandes progressos na medicina, seja na área de diagnóstico como também na abordagem terapêutica de doenças infecciosas, neoplásicas e degenerativas. Com o advento da quimioterapia e transplante de

órgãos, tem-se reduzido significativamente a morbidade e mortalidade causada por doenças degenerativas e aumentado expressivamente a sobrevida destes pacientes. Como fruto destes avanços, pacientes hospitalizados têm se tornado alvo para infecções fúngicas oportunistas, especialmente aquelas causadas por *Trichosporon* spp. Os neutrófilos desenvolvem importante papel na proteção contra tricosporonose, fato comprovado pela alta ocorrência de neutropenia em pacientes com esta infecção. Este gênero tem emergido como um dos maiores agentes de infecções em pacientes neutropênicos e naqueles submetidos à corticoidoterapia, causando infecções agudas ou crônicas. Outras duas populações aparecem apresentando alto risco a estas infecções: pacientes de UTI neonatal e aqueles submetidos a cirurgia. Dentre os fatores de virulência que contribuem para tal infecção já foram investigados na patogenia de tricosporonose a possibilidade de *Trichosporon* spp. possuir receptores para sideróforos facilitando sua proliferação e o fator de adesão envolvendo superfície de cateter. Porém, nenhum estudo foi realizado ainda em relação à microestruturas, tais como apressório, dentre outros, durante o momento de invasão das células do hospedeiro.

O termo tricosporonose é utilizado para designar infecções causadas pelo gênero *Trichosporon* na forma superficial, cutânea ou sistêmica. As tricosporonoses são causadas por diversas espécies do gênero e a mortalidade por estas infecções disseminadas varia de 74% a 83,3%. *Trichosporon asahii* é a espécie mais frequentemente envolvida em micoses sistêmicas, apresentando tendência à disseminação hematogênica.

O aumento do índice de tricosporonose, associado ao alto índice de mortalidade por ele causada, faz com que métodos rápidos e precisos sejam necessários para a identificação deste gênero. Oligonucleotídeos foram desenvolvidos para amplificar pequenos fragmentos da subunidade rDNA de 170-bp do gênero *Trichosporon* e seu emprego obteve sucesso na amplificação do material genético de todas as espécies.

Numerosos métodos moleculares têm sido empregados para subtipar espécies de gêneros de fungos e a análise de DNA por meio da reação em cadeia da Polimerase ("Polymerase Chain Reaction" - PCR) é um dos métodos que têm apresentado melhor resultado. *Trichosporon asahii* e *T. mucoides* foram identificados em soro de pacientes com tricosporonoses através do PCR. A caracterização de

*Trichosporon asahii*, *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. coremiformii* e *T. mucoides* empregando a técnica de amplificação arbitrária de polimorfismos de DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA - RAPD) utilizando protocolo padrão para o gênero *Candida* já foi realizada, o que torna evidente a viabilidade de várias técnicas de biologia molecular que podem ser empregadas para identificação das espécies deste gênero.

O sucesso no tratamento de tricosporonose sistêmica depende da rápida introdução de antifúngicos. Estas leveduras possuem susceptibilidade extremamente variável à anfotericina B e azólicos sendo que algumas amostras apresentam resistência à 5-fluocitosina e à anfotericina B. Os dados obtidos através de testes “*in vitro*” não correlacionam sensibilidade “*in vitro/in vivo*” mas, no entanto, a experiência médica em tratamento de pacientes com infecções sistêmicas por esta levedura mostra prognóstico pobre, confirmando o perfil de resistência obtido em testes de laboratórios. Já foi descrito o perfil de *Trichosporon* frente aos antifúngicos comumente empregados na clínica médica como de maneira variável, desenvolvendo concentrações inibitórias mínimas relativamente altas para anfotericina B e apresentando susceptibilidade extremamente instável a azólicos a qual é bem evidente com o fluconazol. Amostras deste gênero (*T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. asahii* e *T. inkin*) têm apresentado resistência à 5-flucitosina. Fungemia por *Trichosporon* ocorre mesmo em pacientes submetidos ao tratamento profilático com antifúngicos como itraconazol ou anfotericina B. Infecções disseminadas causadas por *Trichosporon* frequentemente são fatais e o teste de susceptibilidade a antifúngicos principalmente de amostras isoladas de pacientes imunocomprometidos pode auxiliar no sucesso da terapia antifúngica.

A dificuldade na identificação das espécies deste gênero, através da fenotipagem, principalmente pela semelhança morfológica e bioquímica com o gênero *Trichosporonoides*, faz necessário a utilização de métodos de biologia molecular, que sejam rápidos, reprodutíveis e confiáveis, empregando iniciadores que possibilitem a diferenciação entre as principais espécies patogênicas para o homem. A identificação das espécies de *Trichosporon* através de técnicas de biologia molecular poderá auxiliar no conhecimento do perfil de susceptibilidade a antifúngicos de cada uma das principais espécies, comparar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos entre as mesmas e, até mesmo, na padronização

do teste de susceptibilidade, uma vez que ainda não existem dados disponíveis na literatura, a esse respeito.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 - HISTÓRICO

Em 1865, Beigel descreveu infecções em pêlos humanos e retratou, pela primeira vez nódulos causados pelo agente de micoses superficiais neste sítio, comumente frequentes em regiões tropicais e subtropicais (ITOH et al., 1996). Este quadro clínico recebeu diversas sinonímias, tais como *Tinea nodosa*, moléstia de Beigel e tricomiose (RIPPON, 1988).

Os nódulos claros localizados nos pêlos da cabeça, barba e bigode, deram o nome a este quadro clínico de “pedra branca”. A dificuldade em isolar o agente etiológico “*in vitro*” na época, impossibilitando qualquer descrição macro e/ou micromorfológica do mesmo, levou este microrganismo a ser considerado por Rabenhorst, em 1867, uma alga a qual denominou *Pleurococcus beigelli*. Somente em 1890, Behend classificou o microrganismo responsável por lesões superficiais causadas em pêlos humanos (RIPPON, 1988; GUÉHO et al., 1994a).

Posteriormente, Behend descreveu um fungo isolado de nódulos de “pedra branca” em bigode, denominando-o *Trichosporon ovoides* (*Trichosporon* significa levedura blasto-artrosporada), e Vullemin, em 1902, o classificou como fungo intitulando-o *Trichosporon beigelli* (RIPPON, 1988; LACAZ et al., 1991; LACAZ et al. 2002).

*Trichosporon cutaneum* surgiu como espécie associada a lesões de pele e foi escolhida como neotipo do gênero. Algumas espécies foram inadequadamente identificadas e se tornaram sinônimo de *T. beigelli*, sendo mantidas neste gênero por apresentarem artroconídios, hidrolisarem uréia e não fermentarem açúcares. Somente *T. pullulans* distinguiu-se das demais pela habilidade em assimilar nitrato. Em 1980, McGinnis incluiu duas novas espécies no gênero *Trichosporon*: *T. fermentans* e *T. capitatum*, incorrendo no mesmo erro de diagnóstico laboratorial já ocorrido com as demais espécies anteriormente descritas (LACAZ et al., 1991; LACAZ et al. 2002). Esta situação levou à redução do gênero a somente duas espécies: *T. beigelli* e *T. pullulans*, e *T. cutaneum* permaneceu como sinônimo de *T. beigelli*. O termo *Trichosporon beigelli* foi adotado pelos médicos enquanto os micologistas optaram por *T. cutaneum* (GUÉHO et al., 1994).

Esta levedura faz parte da microbiota normal da pele (região crural e outros sítios) e pêlo, tendo sido algumas vezes isolada de escarro; está amplamente distribuída na natureza (ar, água, solo, frutas em decomposição, alimentos deteriorados e outros ambientes). Cresce facilmente em ágar Sabouraud dextrose, porém é inibida em meios contendo cicloheximida (RIPPON, 1988; DE HOOG & GUARRO, 1995).

## **2.2 – CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO**

### **2.2.1. CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS**

Kreger-van Rij em 1984 (RIPPON, 1988), reconheceu 500 espécies de leveduras em 60 gêneros. Trinta e quatro gêneros de leveduras eram pertencentes a divisão Ascomycota, 16 a Deuteromycota e 10 a Basidiomycota.

O gênero *Trichosporon* está catalogado como levedura pertencente a divisão Basidiomycota, classe Heterobasidiomycetes e ordem Filobasidiales. A microscopia eletrônica revela parede celular com estrutura lamelar característica de um basidiomiceto, apresentando septos com doliporos ou poros simples. A reprodução sexuada não é descrita. Apresentam urease extracelular e antígenos de parede comuns com antígenos polissacarídeos capsulares de *Cryptococcus neoformans*, evidenciados pela semelhança em estrutura e composição de parede das células. Esta relação filogenética foi confirmada pela sequência de rRNA na qual apresentaram similaridade da sequência 25/26S (DEPREE et al., 1993; DE HOOG & GUARRO, 1995; GUÉHO et al., 1998). Devido a este fato, soro, plasma e líquido céfalo raquidiano de pacientes com tricosporonose disseminada podem reagir com antígenos de *C. neoformans* no teste de aglutinação do látex (WALSH & PIZZO, 1988) gerando confusão no diagnóstico de criptococose.

### **2.2.2. CONSTITUIÇÃO DE PAREDE**

A parede de *Trichosporon* é constituída de proteínas (11%), carboidrato neutro (63%), glucosamina (9%) e ácido glucorônico (13%). Os açúcares que a constituem são glicose (32%), manose (6%) e traços de xilose e galactose. A parede celular rompida com álcali apresenta 2 frações distintas: uma solúvel e outra insolúvel em álcali, ambas contendo quitina. A glucana insolúvel em álcali contém

uma cadeia glicosídica (1-3) e (1-6), parcialmente susceptível à digestão pela enzima  $\beta(1-3)$  gluconase (zimoliase). A fração álcali solúvel contém glucana, manana e polímeros ácidos e apresentam resistência à digestão pela zimoliase (DEPREE et al., 1993). Wen et al. (1999) realizaram experimento com este gênero e aventaram a possibilidade destas leveduras apresentarem grupos carboxilas e resíduos de cisteína essenciais para sua atividade enzimática.

### **2.3 – FATORES DE PREDISPOSIÇÃO DO HOSPEDEIRO E DE VIRULÊNCIA DO FUNGO**

Vários fatores predis põem os pacientes às infecções fúngicas. Defeitos das células imunes, ulcerações da pele, orofaringe e trato gastrointestinal são os mais conhecidos entre eles. Outros fatores que concorrem para tal são: uso de antibacterianos de amplo espectro, regimes terapêuticos imunossupressores (quimioterapia citotóxica), uso de novas e agressivas estratégias terapêuticas ou sistema de suporte de vida (equipamentos respiratórios e outros) (HAZEN, 1995). A presença de um ou mais destes fatores predis põe o paciente à infecção, entretanto não é raro alguns pacientes apresentarem múltiplos fatores ao mesmo tempo (ANAISSIE, 1992).

Em relação às células imunes, Anaissie (1992) sugere que os neutrófilos desenvolvem importante papel na proteção contra tricosporonose, devido à alta incidência de pacientes neutropênicos com esta infecção, com resposta pobre à terapia antifúngica, quando a neutropenia persiste. Para reforçar esta proposição, este autor realizou experimento em murinos que demonstrou aumento da mortalidade por tricosporonose e grande número de células fúngicas observadas em tecido de animais neutropênicos, quando comparados com animais controle.

Quanto às propriedades de virulência dos fungos, estas foram melhor estudadas através do gênero *Candida*, porém abrangem fungos em geral. Os principais fatores de virulência desses microrganismos são a capacidade de aderência e produção de toxinas e enzimas, interação com hormônios e o metabolismo do ferro. É possível que *Trichosporon* spp. possua receptores para sideróforos e que o excesso de ferro possa facilitar sua proliferação dentro do paciente (GUÉHO et al., 1994a). O fator adesão envolvendo superfície de cateter

também foi observado nos gêneros *Trichosporon* e *Fusarium*, que emergiram como patógenos, causando fungemia em pacientes imunocomprometidos (DOUGLAS, 1985; VARTIVARIAN, 1992).

## 2.4 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

A observação da macromorfologia das colônias revela coloração branca ou creme, podendo ser mucosas ou secas, apresentando ou não aspecto branco farinhoso. A micromorfologia revela presença de micélio verdadeiro e pseudo-micélio, artroconídios hialinos abundantes e conídiosporos laterais e clavados facultativos. Apressório, sarcina (células elipsóides, dilatadas isodiametricamente e subdivididas internamente em poucas células separadas), células gigantes fusiformes e endoconídios estão presentes ocasionalmente (LACAZ et al., 1991; GUÉHO et al., 1994; GUÉHO et al., 1998; LACAZ et al. 2002).

O gênero é caracterizado pela presença de artroconídios mas, poucas espécies possuem caracteres morfológicos distintos tais como apressório, macroconídiosporos ou conidiação meristemática (GUÉHO et al., 1992; GUÉHO et al., 1994b; GUÉHO et al., 1998). Segundo Guého et al. (1998), apenas duas espécies apresentam a estrutura apressório: *T. inkin*, que apresenta também sarcina e artroconídios cilíndricos e *T. ovoides*. Lacaz et al. (1991) descrevem apressório como órgão adesivo de esporos em germinação, extensivo a qualquer parte do micélio que exerça função de verdadeiro órgão de fixação. Este órgão se desenvolve como protuberância adaptada à superfície do hospedeiro e se origina da diferenciação que ocorre nos filamentos micelianos. Essa diferenciação entre hifas recebe o nome de anastomose, sem haver plasmogamia no gênero *Trichosporon*. Estas anastomoses podem ser vegetativas, sexuais, parasitárias e em ganchos ou em pinça. As hifas dos micélios superficiais podem adentrar o interior das células do hospedeiro, em forma de pequenos prolongamentos a fim de absorver os alimentos para sua sobrevivência: são os haustórios, suctórios ou sugadores.

Outras espécies se distinguem por apresentarem artroconídios com brotamento intumescidos e distantes (*T. sporotrichoides*), células terminais intumescidas (*T. mucooides*), conídios laterais globosos (*T. jirovecii* e *T. laibachii*), células gigantes fusiformes (*T. loubieri*), conidiação meristemática (*T. asteroides*),



conídios laterais esféricos (*T. pullulans*) ou conídios laterais clavados (*T. moniliiforme*) (GUÉHO et al., 1998).

## 2.5 – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA (DNA)

### 2.5.1. GENOTÍPICA

Cento e uma amostras foram utilizadas na revisão deste gênero realizada por Guého et al. (1992), empregando para tal, características morfológicas, ultraestruturais, fisiológicas, conteúdo de G+C de mol% de DNA, reassociação de DNA/DNA e sequência parcial de 26S rRNA. Dezenove (19) espécies foram caracterizadas, quinze (15) apresentando sistema de coenzimas Q-9 (*T. aquatile*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. brassicae*, *T. coremiiforme*, *T. dulcitum*, *T. faecale*, *T. gracile*, *T. inkin*, *T. laibachii*, *T. loubieri*, *T. montevideense*, *T. ovoides*, *T. pullulans* e *T. sporotrichoides*) e quatro espécies (*T. cutaneum*, *T. jirovecii*, *T. moniliiforme*, *T. mucoides*) desenvolvendo sistemas de coenzimas Q-10. Coenzima Q atua como cofator orgânico não proteico que desempenha papel acessório nos processos catalizados por enzimas e são detectados através de cromatografia líquida de alta performance (“High Performance Liquid Chromatography” - HPLC). As dezenove espécies foram agrupadas no mesmo gênero por apresentarem grande homologia genética na análise da sequência de rRNA, com exceção de *T. pullulans*. Esta mesma análise da sequência ribossomal revelou distinção entre cada uma das espécies. O nome *T. beigelli* não foi mantido por ser considerado inadequado. Algumas amostras deste gênero de leveduras ainda estão sendo estudadas pelos mesmos métodos acima citados (GHÉHO et al., 1994; GUÉHO et al., 1998). Sugita et al. (1997), empregando o método de sequenciamento da subunidade de rDNA, descreveram uma nova espécie denominada *T. domesticum*. Este mesmo método foi utilizado por Middelhoven et al. que descreveram outra espécie intitulada *T. guéhoae* em 1999, e outras cinco novas espécies em 2004: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*, sendo ao todo hoje, 26 espécies.

Segundo Shinoda (SUGITA et al., 1997) esta filogenia molecular apresenta correlação com os sorotipos por ele detectados ao realizar investigação sorológica sobre espécies de *Trichosporon* na qual encontrou 3 sorotipos (I, II e III) usando fator

soro específico, e um quarto sorotipo I-III do grupo *T. gracile* e *T. dulciturum*, que segundo a literatura não foram isolados de infecções no homem.

### 2.5.2. IDENTIFICAÇÃO PELO MÉTODO CLÁSSICO

As primeiras provas de identificação empregadas por Guého et al. (1992) utilizam o método clássico, onde testes de assimilação de carboidratos e de nitrato, somados à observação macro e microscópica da morfologia destas leveduras possibilitam a identificação das espécies mais frequentes. Estes autores elaboraram uma tabela onde todas as espécies descritas podem ser identificadas através de seu comportamento frente à vários açúcares. Provas adicionais como crescimento em temperaturas superiores à 30°C também são empregadas. As leveduras deste gênero não fermentam carboidratos, o que as diferenciam do gênero *Trichosporonoides* e o fato de hidrolisarem uréia as distinguem do gênero *Geotrichum*. *Trichosporon cutaneum* e *T. jirovecii* são as únicas espécies que crescem bem à 20-22°C e à 42°C, respectivamente. *Trichosporon inkin* e *T. ovoides* se distinguem morfológicamente das demais por serem as duas únicas espécies que produzem apressório, embora de maneiras distintas. A assimilação de nitrato é realizada exclusivamente por *T. pullulans* enquanto *T. sporotrichoides* é o único a utilizar creatinina. Apenas sete espécies assimilam melibiose e o mesmo número de leveduras utiliza galactiol.

### 2.5.3. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA POR MEIOS COMERCIAIS

O CHROMagar *Candida* é um meio de cultura cromogênico diferencial que visa facilitar o isolamento e identificação presuntiva das principais espécies de leveduras clinicamente importantes. Odds & Bernaerts (1994) testaram 34 amostras de *Trichosporon* spp. e observaram que as colônias destas leveduras cresciam com aspecto sempre constante e bastante peculiar de modo a permitir o diagnóstico deste gênero. Estudo similar com resultado idêntico foi desenvolvido por Giusiano & Mangiaterra (1998). Outros meios como RapID Yeast Plus System (KITCH et al., 1996; ESPINEL-INGROFF et al., 1998b) têm sido testados para identificação deste gênero, porém sem sucesso, por o identificarem como *Cryptococcus neoformans*.

### 2.5.4. MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

O aumento do índice de tricossponose associado à mortalidade por ele causada, faz com que métodos rápidos e precisos sejam necessários para a identificação deste gênero. Numerosos métodos moleculares têm sido empregados para subtipar espécies de *Candida*, bem como outros gêneros de fungos (PFALLER, 1995a). A análise de DNA é um destes métodos. Muller et al. (1998) realizaram um estudo comparativo entre dois métodos de extração de DNA de *Trichosporon*: o primeiro empregando fenol e clorofórmio e o segundo a ruptura da célula por alta velocidade, associado a reagentes caotrópicos (cuja função é aumentar a solubilidade de substâncias não polares em H<sub>2</sub>O; ex.: cloreto de guanidina). Esses autores observaram que o procedimento de extração através de alta velocidade resultou na obtenção de DNA com qualidade e quantidade, o que foi demonstrado na execução das técnicas de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Outra vantagem da técnica, além da eficiência, é a rapidez, apenas uma hora empregando alta velocidade enquanto o emprego de fenol e clorofórmio necessita de seis horas.

Sugita et al., (1998b) desenvolveram oligonucleotídeos baseados na região ITS (espaçadores internos transcritos) para amplificar SSU (Small-Subunit rDNA), pequenos fragmentos da subunidade rDNA (1998a), de 500-bp do gênero *Trichosporon* e obtiveram sucesso na amplificação de todas as espécies de *Trichosporon*, exceto para *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* e outras espécies deste gênero (SUGITA et al., 2000). Este mesmo grupo de pesquisadores obtiveram excelentes resultados avaliando a região intergênica do DNA ribossomal do gênero *Trichosporon* e concluíram que a região IGS1 é a mais conveniente para a diferenciação filogenética entre as espécies intimamente relacionadas (SUGITA et al., 2002).

## **2.6 TRICHOSPORON: UM PATÓGENO EMERGENTE**

O gênero *Trichosporon* é um saprófita facultativo e algumas espécies fazem parte da microbiota oral e anorretal. Kam et al. (2002) isolaram *T. beigelli* colonizando unha de indivíduo saudável. Embora seja apresentado em vários estudos como componente raro do trato gastro intestinal, chega a causar infecção

neste sítio em pacientes imunossuprimidos (RIPPON, 1988; WALSH & PIZZO, 1988; LACAZ et al., 1991; SAME-EKOBO, 1997; LACAZ et al. 2002).

O termo tricosporonose é conhecido como infecção causada pelo gênero *Trichosporon* nas formas superficial, cutânea ou sistêmica. A forma disseminada é adquirida via endógena por pacientes hospitalizados (WANG & LIN, 1999). Pulmões, rins, pele e olhos são alguns dos muitos sítios alvo deste patógeno, que pode destruir completamente glomérulos renais (WALSH & PIZZO, 1988).

Em 1995 Sugita et al. re-identificaram leveduras previamente caracterizadas como *T. cutaneum*. Dentre estas, dez amostras isoladas de infecções de mucosas foram identificadas como *T. asahii* (09) e *T. ovoides* (01); duas obtidas de micoses superficiais foram caracterizadas como *T. cutaneum* (01) e *T. montevideense* (01). Este trabalho comprova que as tricosporonoses são causadas por várias espécies do gênero.

Mayser et al. (1996) realizaram estudo igual ao descrito anteriormente e observaram que amostras isoladas de diferentes sítios, identificadas anteriormente como *T. cutaneum*, resultaram na identificação de seis espécies frequentemente envolvidas em infecções humanas. *Trichosporon inkin* foi isolado de infecção cutânea (pele e unha), superficial (pedra) e sistêmica; *T. mucoides* de doença sistêmica e cutânea (pele e unha); *T. ovoides* de infecção cutânea e superficial (pedra); *T. asteroides* e *T. cutaneum* apenas de infecção cutânea, enquanto *T. asahii* somente de sistêmica. Atualmente, estudos taxonômicos indicam que tricosporonose é causada por estas seis espécies: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides*. É possível que o agente causador de tricosporonose difira no tipo de infecção que causa. Segundo Sugita et al. (1998b), *Trichosporon asahii* está envolvido em infecções profundas, enquanto *T. asteroides* e *T. cutaneum* estão associados com infecções superficiais. *Trichosporon ovoides* e *T. inkin* são comumente isolados em pedra branca, ocorrendo a primeira espécie na cabeça e a segunda em área genital. *Trichosporon domesticum* e *T. pullulans* não são agentes de tricosporonose e raramente são isolados de pacientes.

## **2.7 – CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES NO HOMEM**

### 2.7.1. *Trichosporon ovoides*

*Trichosporon ovoides* apresenta, em ágar Sabouraud dextrose, colônias com dez a treze milímetros de diâmetro em dez dias de crescimento. As colônias são secas, brancas, farinhasas, com pregas irregulares ao centro e pequena zona marginal. A cultura em lâmina em meio de ágar extrato de malte revela formação regular de apressório. Esta espécie não cresce na presença de inositol mas tolera 0,01% de cicloheximida (GUÉHO et al., 1994). É mais frequentemente isolada de micoses superficiais (“pedra branca”) e cutâneas mas Sugita et al. (1998a) relataram o primeiro caso de pneumonite “summer-type hypersensitivity” por este agente etiológico em 1998b.

### 2.7.2. *Trichosporon inkin*

*Trichosporon inkin* exibe, em ágar Sabouraud dextrose, colônias com nove a doze milímetros de diâmetro em dez dias de crescimento. As colônias são cerebriformes, brancas, farinhasas, apresentando ou não zona marginal. Cultura em lâmina utilizando ágar extrato de malte exibem formação regular de apressório e hifas desarticuladas apresentando artroconídeos mais ou menos cilíndricos. Em meio contendo alta concentração de açúcar apresentam sarcina. Crescem na presença de inositol, mas não de L-arabinose. Esta espécie tem sido isolada de micoses superficiais (pedra branca em pêlos pubianos) e cutâneas (ânus), assim como de micoses sistêmicas, causando infecções no endocárdio e peritônio (GUÉHO et al., 1994a). Lopes et al. (1997) relatam peritonite desenvolvida em paciente submetido à diálise peritoneal contínua. Chaumetin et al. (1996) descrevem quadro de endocardite em paciente com válvula mitral, na qual foi detectada a vegetação desta levedura. Um caso de abscesso pulmonar foi relatado em paciente com doença granulomatosa crônica que apresentava sinais e sintomas como pústulas no peito e febre persistente levando o paciente a óbito mesmo com terapia antifúngica (PIWOZ et al., 2000). *Trichosporon inkin*, causador de endocardite em paciente do sexo feminino com 46 anos de idade apresentou sensibilidade à anfotericina B (CIM 0,63 µg/mL), itraconazol (CIM 0,2 µg/mL), resistência à 5-flucitosina (CIM 100µg/mL) e susceptibilidade dose-dependente (SDD) ao fluconazol (CIM 3,2 µg/mL); foi tratada com anfotericina B associada com itraconazol e se recuperou em sete semanas (CHAUMETIN et al., 1996).

### 2.7.3. *Trichosporon asahii*

*Trichosporon asahii* revela, em ágar Sabouraud dextrose, colônias secas, brancas, farinhasas, com fortes fissuras na margem e com 16 a 24 milímetros de diâmetro em dez dias. Microcultivo em lâmina empregando meio de ágar extrato de malte revela hifas desarticuladas em artroconídeos regulares, eventualmente em forma de barril. Assimila L-arabinose mas não cresce em presença de inositol (GUÉHO et al., 1994b). Os casos de “piedra branca” publicados originaram-se de mamíferos com pêlos. Em cortes histológicos apresentam-se como leveduras em brotamento. Esta levedura apresenta uma predileção por disseminação hematogênica (ITOH et al., 1996; ABLIZ et al., 2002; YANG et al. 2003). Infecções disseminadas ou sistêmicas localizadas associadas à cateter em pacientes imunossuprimidos, são frequentemente causadas por esta espécie (LOPES et al., 1997). Chakrabarti et al. (2002) relatam um caso de linfadenopatia generalizada causada por *T. asahii* em paciente com síndrome de Job, um quadro clínico caracterizado por IgE elevada e eosinofilia. Fungemia por esta levedura está associada com múltiplas lesões papulares e purpúricas no abdome e extremidades. Pacientes após quadro de hepatite apresentaram esta levedura no sangue; outros a tiveram isolada de lesões de pele (GUÉHO, 1994a). Panagopoulou et al. (2002), relataram infecções invasivas em neonatos por este agente e, segundo Hirakata et al. (2002), *Trichosporon asahii* é um dos principais agentes responsáveis por quadros de asma por hipersensibilidade no Japão.

### 2.7.4. *Trichosporon asteroides*

*Trichosporon asteroides* apresenta, em ágar Sabouraud dextrose, colônias cerebriformes, com zona radial sulcada, aparência de cabelo emaranhado, e que crescem em torno de dez milímetros de diâmetro em dez dias. A cultura em lâmina em ágar extrato de malte possibilita observação de hifas que podem ou não estar desarticuladas em artroconídeos e eventuais células septadas. Esta espécie assimila L-arabinose mas não cresce na presença de inositol, é fisiologicamente indistinguível de *T. asahii* e *Fissuricella filamenta*. Entretanto, difere notavelmente desta última pela morfologia. As culturas de *Fissuricella filamenta* mostram colônias de expansão limitada, se apresentam densamente cerebriformes, começando a escurecer com o

passar do tempo. *Fissuricella filamenta* tem sido descrita como idêntica a esta espécie com base na reassociação de DNA/DNA e apenas uma sequência foi encontrada como sendo variável entre as duas leveduras na região 26S rRNA. Muitas amostras de *T. asteroides* têm sido isoladas de sangue de paciente imunossuprimidos (GUÉHO et al., 1994a). Kustimur et al. (2002) relataram o primeiro caso de infecção sangüínea por este agente, acometendo paciente de unidade de terapia intensiva, sendo isolado de sangue, urina e fluido de tubo endotraquel e posteriormente identificado através de análise de DNA.

#### 2.7.5. *Trichosporon cutaneum*

*Trichosporon cutaneum* desenvolve colônias com 15 a 17 milímetros de diâmetro em dez dias em ágar Sabouraud dextrose; são cerebriformes, brilhantes, nunca se apresentam farinhosas, desenvolvem ampla zona marginal fissurada. Culturas jovens podem revelar simples células em brotamento mas, após repiques começam a desenvolver hifas com artroconídeos e ramificações retraídas. Cresce em presença de melibiose mas não à 37°C e não crescem em presença de cicloheximida 0,01%. Atualmente, *T. cutaneum* é uma espécie restrita, ocorrendo raramente. Os casos confirmados são de lesões de pele e piedra branca axilar (GUÉHO et al., 1994b) e infecção superficial nos pés (ARCHER-DUBON et al., 2003). No entanto, Morimoto et al. (1994), relatam fungemia em dois pacientes com leucemia mieloblástica aguda adquirida durante quimioterapia. Recentemente, Chang et al. (2003) descreveram um caso de paciente com foliculite e septicemia por este agente.

#### 2.7.6. *Trichosporon mucoides*

*Trichosporon mucoides* exhibe, em ágar Sabouraud dextrose, colônias úmidas, brilhantes, elevadas, com pequenas e profundas fissuras radiais, muito similares à cultura de *T. cutaneum*, que se desenvolvem com 13 a 17 milímetros de diâmetro em dez dias. Formam cadeias irregulares de artroconídeos, começando com pequenas ramificações laterais e terminando com conídeosporos clavados. Crescem na presença de melibiose, à 37°C e são tolerantes à cicloheximida 0,01%. Muitos isolados têm sido derivados de micoses disseminadas em pacientes imunossuprimidos e raramente de piedra branca púbica. Segundo Guého et al.

(1994b) foi isolado de onicomicose repetidas vezes. Recentemente tem sido isolado de infecções sistêmicas em prematuros (GÖKAHMETOGLU et al., 2002), em crianças utilizando broncoscópio com defeito (SINGH et al., 2003) e em pacientes transplantados (NETTLES et al., 2003).

## 2.8. EPIDEMIOLOGIA DAS TRICOSPORONOSSES

Hazen (1995), após revisão da literatura, cita várias espécies de leveduras isoladas com maior frequência, entre elas *Blastomyces capitatus*, *Candida tropicalis*, *Malassezia furfur*, *Trichosporon beigelli* e *Phaeoannelomyces elegans*. As mais comumente isoladas de sangue têm sido *Hansenula anomala*, *Blastochytrium capitatus*, *Rhodothorula* spp. e *Trichosporon beigelli*. A mudança na frequência de isolamento reflete também a habilidade de médicos e microbiologistas em reconhecer *Candida* não-*albicans* e outros fungos como patógenos oportunistas importantes, associada à sensibilidade dos sistemas de cultura e procedimentos empregados para favorecer o crescimento destas leveduras incomuns (KREMERY et al., 1999a). A colonização mucocutânea por *Trichosporon* em crianças infectadas pelo HIV foi descrita por Don et al. (1995) e segundo Singh et al. (1999) foi responsável por 10% da colonização por leveduras em geral (71,4%) que acometeu neonatos prematuros.

O primeiro caso de infecção disseminada por *Trichosporon* foi descrito por Watson & Kallichurum em 1970 (RIPPON, 1988) no qual o paciente tinha carcinoma brônquico e depois desenvolveu abscesso cerebral. A revisão da literatura realizada por Hoy et al. (LACAZ et al., 1991) dentro de um período de 10 anos (1974-1984), registrou 19 pacientes com infecção disseminada por *Trichosporon* spp. salientando a gravidade e o crescente aumento dessa infecção fúngica oportunista em pacientes imunocomprometidos. A infecção manifestava-se por febre ou pneumonia, sendo o diagnóstico esclarecido somente após óbito, em 25% dos casos. Os pacientes desenvolveram quadros pneumônicos, endoftalmite, endocardite e quadros invasivos. *Trichosporon* spp. foi isolado de amostras de sangue, urina, e escarro dos pacientes. No início da infecção os pacientes estavam neutropênicos, estando a recuperação dos mesmos diretamente relacionada com a imunossupressão medular. Apesar do emprego de anfotericina B associada com 5-flucitosina, a taxa de



mortalidade atingiu 74%. Segundo Kremery et al. (1999b) a mortalidade de tricosporonose hematogênica é significativamente maior que a causada por *Candida* (83,3% e 15,8% respectivamente). Mooty et al. (2001), relatam caso de endocardite por este agente em um paciente logo após ter implantação de uma prótese mitral e, ao investigarem a literatura, descobriram haver onze casos de endocardite causada por *Trichosporon* descritos entre 1966 a 2000.

Lesões cutâneas secundárias à septicemia foram descritas por vários autores (RIPPON, 1988; LASCAUX, et al., 1998). Eles observaram múltiplas pápulas purpúricas e nódulos com necrose central e fortes pontos hemorrágicos.

*Trichosporon* tem sido envolvido em fungemia (KREMERY et al., 1998; FARINA et al., 1999; AL-HEDAITHY, 2003) e infecções sanguíneas em pacientes com queimaduras (HAJJEH & BLUMBERG, 1994). Tem sido isolado de lavado broncoalveolar em pacientes imunocomprometidos (SHADZI & CHADEGANIPOUR, 1996), causando mucosite oral (HSU et al., 1998), meningoencefalite (LASCAUX et al., 1998) e infecção do trato urinário em transplantado renal (LUSSIER et al., 2000).

Um caso de tricosporonose disseminada associada com infecção por *Candida* em bexiga foi apresentado em 1989 por Kimura et al., no qual comprova-se que a diferença morfológica entre os dois gêneros é menos eficiente em corte histológico que imunohistoquímica. Somente anti-soros anti-*Trichosporon* e anti-*Candida* foram capazes de diagnosticar a infecção mista por estes dois agentes. O gênero *Trichosporon* produz células leveduriformes e pseudohifas em tecidos, tornando o diagnóstico diferencial com candidose extremamente difícil (LACAZ et al., 1991). Duas populações apresentam maior risco de infecções fúngicas requerendo monitoramento contínuo: são os pacientes de UTI neonatal e os de cirurgia. A incidência de infecções fúngicas nestes pacientes têm aumentado significativamente nas duas últimas décadas (HAZEN, 1995) e chega a ser responsável por aproximadamente 50% das infecções hospitalares em pacientes de risco nos Estados Unidos da América (PFALLER, 1995b). Segundo Farina et al. (1999) atingiu 50% a mortalidade nos casos de infecção por *Trichosporon* spp., e naqueles pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, internados nos últimos dez anos (1988-1997) no Regional Italian Hospital, Bergamo, Itália a mortalidade por fungemia atingiu 50,6%.

## 2.9 – PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE *TRICHOSPORON* A DROGAS ANTIFÚNGICAS

Um paciente com linfoma não Hodgkins desenvolveu falência renal aguda após tricosporonose disseminada e veio a óbito mesmo tratado com anfotericina B (PAYNE & TEALL, 1989). De acordo com Fridkin & Jarvis (1996) os isolados de sangue são mais resistentes à anfotericina B que os isolados de pele. *Candida rugosa* e *T. beigelli* podem apresentar concentrações inibitórias mínimas relativamente altas para esta droga. Várias espécies de *Candida*, *S. cerevisiae* e *T. beigelli* apresentam susceptibilidade extremamente variável à azólicos, fato evidente com fluconazol (HAZEN, 1995). Guého et al. (1994) encontraram amostras do gênero *Trichosporon* resistentes à 5-flucitosina (*T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. asahii* e *T. inkin*). O tratamento com fluconazol é provavelmente mais ativo que com anfotericina B, mas a associação destes antifúngicos para pacientes gravemente enfermos tem sido considerada eficaz enquanto terapia prolongada se faz necessária em casos de infecção crônica disseminada por *Trichosporon* (PERFECT & SCHELL, 1996). Estudos realizados com administração profilática de fluconazol em neonatos nas primeiras seis semanas de vida comprovaram a eficácia deste azólico na prevenção de colonização e infecção fúngica invasiva nesta população. Enquanto *T. mucoides* foi isolado do grupo placebo, nenhuma levedura foi recuperada do grupo que recebeu fluconazol (KAUFMAN et al., 2001).

O aumento da incidência e da gravidade de infecções fúngicas tem levado ao interesse no desenvolvimento de novas terapêuticas apropriadas (RYDER, 1999). A terbinafina representa a mais recente classe de antimicóticos introduzida no mercado, embora seja frequentemente indicada para o tratamento de infecções por dermatófitos, tem apresentado atividade significativa contra leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*. Voriconazol, um novo antifúngico monotriazólico de amplo espectro, tem mostrado alta atividade contra *Candida* e *Trichosporon*, inclusive em amostras de *Candida krusei* e *C. glabrata* resistentes a fluconazol (UZUM et al., 2000).

Contudo, estes dados são insuficientes para padronização de um teste “*in vitro*” e não correlaciona a sensibilidade “*in vitro/in vivo*”. Mesmo sem conseguir estabelecer este padrão, a experiência médica em tratamento de pacientes com

trichosporonose comprova que o prognóstico é pobre. Segundo Arikan & Hasçelik (2002), o método do National Committee for Clinical Laboratory Standards M27A inclui *Candida* e *Cryptococcus*, mas não *Trichosporon*, e os relatos de espécies resistentes à anfotericina B, de acordo com a nova nomenclatura não são claros, sendo pouco conhecido o perfil de algumas espécies a drogas antifúngicas.

## 3. OBJETIVOS

---

### 3.1. Objetivo geral

3.1.1. Identificar com base na caracterização fenotípica e genotípica amostras de *Trichosporon* spp. envolvidas em infecções em humanos.

### 3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Caracterização genotípica do gênero *Trichosporon* através da região ITS, das amostras padrão CBS e das isoladas de pacientes;

3.2.2. Definir um iniciador capaz de diferenciar as espécies de *Trichosporon* através do RAPD;

3.2.3. Comparar o grau de eficiência do método clássico com o método de biologia molecular para identificação até espécie das amostras analisadas;

3.2.4. Definir o perfil de susceptibilidade de amostras de leveduras do gênero *Trichosporon* para seis antifúngicos: anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, terbinafina e voriconazol.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. Amostras

Foram obtidas 65 amostras de bancos de culturas de Laboratórios de Microbiologia e/ou Micologia de diversas regiões do país (Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais) e Estados Unidos da América, e de sítios anatômicos diferentes. As amostras enviadas com identificação segundo a nova taxonomia foram submetidas a novos testes juntamente com aquelas identificadas como *T. beigelli*. O quadro abaixo relaciona as amostras obtidas.

### 4.2. Manutenção das amostras

As amostras foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose com 300 mg/L de cloranfenicol e em caldo BHI (Brain Heart Infusion), ambos à 4°C.

**Quadro 1 – Relação e características das amostras obtidas**

| <b>Nº</b> | <b>Código</b>    | <b>Origem</b>  | <b>Sítio</b>               | <b>Espécie</b>         |
|-----------|------------------|----------------|----------------------------|------------------------|
| 01        | L-099            | LEMI           | Desconhecido               | <i>T. coremiiforme</i> |
| 02        | JF-560           | HE-UFJF        | Interdígitos               | <i>T. beigelli</i>     |
| 03        | JF-690           | HE-UFJF        | Unha (pés)                 | <i>T. beigelli</i>     |
| 04        | JF-164/98        | HE-UFJF        | Unha                       | <i>T. beigelli</i>     |
| 05        | JF-105           | HE-UFJF        | Unha                       | <i>T. beigelli</i>     |
| 06        | JF-295/00        | HE-UFJF        | Unha                       | <i>T. beigelli</i>     |
| 07        | JF-64            | HE-UFJF        | Escama de pele             | <i>T. beigelli</i>     |
| 08        | R-67             | HSP- LEMI      | Ambiente hospitalar (piso) | <i>T. inkin</i>        |
| 09        | JF-99            | HE-UFJF        | Unha                       | <i>T. beigelli</i>     |
| 10        | JF-578           | HE-UFJF        | Unha (pés)                 | <i>T. beigelli</i>     |
| 11        | 2191             | LEMI           | Urina                      | <i>T. asahii</i>       |
| 12        | 1575             | LEMI           | Fragmento de músculo       | <i>T. mucoides</i>     |
| 13        | 4045             | LEMI           | Unha                       | <i>T. coremiiforme</i> |
| 14        | 151              | LEMI           | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 15        | 286              | LEMI           | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 16        | JP-795           | LEMI           | Pêlo (cabeça)              | <i>T. beigelli</i>     |
| 17        | G-149            | LEMI           | Pêlo (cabeça)              | <i>T. beigelli</i>     |
| 18        | G-1919           | LEMI           | Pêlo (cabeça)              | <i>T. beigelli</i>     |
| 19        | LK-33b           | HSP - LEMI     | Mucosa oral                | <i>T. beigelli</i>     |
| 20        | 846              | HSP- LEMI      | Sangue                     | <i>T. beigelli</i>     |
| 21        | 845              | HSP- LEMI      | Sangue                     | <i>T. beigelli</i>     |
| 22        | Microlife-1707   | Lab. Microlife | Unha                       | <i>T. beigelli</i>     |
| 23        | 28636198         | IAL            | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 24        | 285-42037        | IAL            | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 25        | 27622959         | IAL            | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 26        | T-081            | LEMI           | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 27        | T-082            | LEMI           | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 28        | IAL-60           | IAL            | Desconhecido               | <i>T. asahii</i>       |
| 29        | IAL-66           | IAL            | Desconhecido               | <i>T. beigelli</i>     |
| 30        | IAL-69           | IAL            | Desconhecido               | <i>T. mucoides</i>     |
| 31        | UFMG-FCIA        | UFMG           | Desconhecido               | <i>T. beigelli</i>     |
| 32        | UFMG             | UFMG           | Ceratite                   | <i>T. beigelli</i>     |
| 33        | 022              | HSP- LEMI      | Control Lab                | <i>T. beigelli</i>     |
| 34        | 023              | HSP- LEMI      | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 35        | 024              | HSP- LEMI      | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 36        | 032              | HSP- LEMI      | Urina                      | <i>T. beigelli</i>     |
| 37        | 019 <sub>B</sub> | HSP- LEMI      | Lavado bronco-alveolar     | <i>T. beigelli</i>     |
| 38        | Bco 48           | HSP- LEMI      | Sangue                     | <i>T. beigelli</i>     |
| 39        | Bco 346          | HSP- LEMI      | Sangue                     | <i>T. beigelli</i>     |

**Cont. Quadro 1 – Relação das amostras obtidas**

|     |                    |           |                |                    |
|-----|--------------------|-----------|----------------|--------------------|
| 40  | Bco 309            | HSP- LEMI | Sangue         | <i>T. beigelli</i> |
| 41  | Bco 255            | HSP- LEMI | Sangue         | <i>T. beigelli</i> |
| 42  | 72 <sub>c</sub>    | HSP- LEMI | Mucosa oral    | <i>T. beigelli</i> |
| 43  | 95b <sub>1</sub>   | HSP- LEMI | Mucosa oral    | <i>T. beigelli</i> |
| 44  | 106b <sub>1c</sub> | HSP- LEMI | Mucosa oral    | <i>T. beigelli</i> |
| 45  | 22 <sub>c</sub>    | HSP- LEMI | Mucosa oral    | <i>T. beigelli</i> |
| 46  | 33 <sub>b</sub>    | HSP- LEMI | Mucosa oral    | <i>T. beigelli</i> |
| 47  | XXIVC <sub>2</sub> | HSP- LEMI | Mucosa oral    | <i>T. beigelli</i> |
| 48  | 103 <sub>c2</sub>  | HSP- LEMI | Mucosa oral    | <i>T. beigelli</i> |
| 49  | 15 <sub>c</sub>    | HSP- LEMI | Mucosa oral    | <i>T. beigelli</i> |
| 50  | Lemi 1856          | HSP- LEMI | Cateter        | <i>T. beigelli</i> |
| 51  | Lemi 1919          | HSP- LEMI | Urina (sonda)  | <i>T. beigelli</i> |
| 52  | Lemi 1920          | HSP- LEMI | Urina (sonda)  | <i>T. beigelli</i> |
| 53  | 245                | LEMI      | Urina          | <i>T. beigelli</i> |
| 54  | 269                | LEMI      | Urina          | <i>T. beigelli</i> |
| 55  | 242                | LEMI      | Urina          | <i>T. beigelli</i> |
| 56  | 243                | LEMI      | Urina          | <i>T. beigelli</i> |
| 57  | 196                | LEMI      | Urina          | <i>T. beigelli</i> |
| 58  | 199                | LEMI      | Urina          | <i>T. asahii</i>   |
| 59  | 188                | LEMI      | Urina          | <i>T. ovoides</i>  |
| 60  | 30                 | LEMI      | Urina          | <i>T. asahii</i>   |
| 61  | 38                 | LEMI      | Urina          | <i>T. beigelli</i> |
| 62  | 193                | LEMI      | Urina          | <i>T. ovoides</i>  |
| 63  | IAL-47             | IAL       | Desconhecido   | <i>T. beigelli</i> |
| 65  | 65/HE-FMIt         | HE-FMIt   | Escama de pele | <i>T. beigelli</i> |
| 115 | 115/HE-FMIt        | HE-FMIt   | Escama de pele | <i>T. beigelli</i> |

HE-UJFJ = Hospital Escola da Universidade Federal de Juiz de Fora

HSP = Hospital São Paulo – Lab. Especial de Micologia

HE-FMIt = Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Itajubá

Lab. Microlife = Laboratório de Microbiologia Microlife

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

IAL = Instituto Adolfo Lutz

### **4.3. Identificação fenotípica das leveduras**

Para a identificação das leveduras foi utilizado o método considerado padrão, o método clássico, que é baseado no uso de provas bioquímicas, morfológicas e fisiológicas (KREGGER-VAN RIJ, 1984; GUÉHO et al., 1998; KURTZMAN & FELL, 1998).

Amostras padrão CBS (CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Baarn, The Netherlands) foram usadas como referência em todos os testes realizados. Foram utilizadas cinco dentre as seis espécies mais comumente isoladas em infecções no homem, segundo a literatura (ARIKAN & HASÇELIK, 2002): *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutanem*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides*. Em todos os experimentos optou-se por trabalhar com as espécies envolvidas em infecções sistêmicas, cutâneas e subcutâneas e, portanto, com aquelas cujo crescimento acontece à 37°C. Consequentemente foi excluída *T. cutaneum*. Foi incluída uma espécie pouco freqüente em isolamento em humanos, *T. coremiiforme*, com a finalidade de ampliar a possibilidade de identificação. As amostras de referência utilizadas foram *T. asahii* (CBS – 2479), *T. coremiiforme* (CBS -2482), *T. asteroides* (CBS - 3481), *T. inkin* (CBS - 5585), *T. mucoides* (CBS - 7625) e *T. ovoides* (CBS – 7556).

#### **4.3.1. Prova de crescimento à 37°C**

Todas as amostras obtidas dos referidos bancos de culturas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose com 300mg/L de cloranfenicol e incubadas à 37°C por 72 horas, para observação da ocorrência de crescimento e também para verificar a pureza da amostra, além de detectar a presença do *Trichosporon cutaneum*, por ser a única do gênero a não crescer nessa temperatura.

#### **4.3.2. Análise morfológica**

##### **4.3.2.1. Aspectos macromorfológicos**

Foram os seguintes aspectos macromorfológicos observados nas colônias: tamanho, margem, elevação, cor, superfície, opacidade, consistência e odor. Para tal foi empregada a técnica da obtenção de Colônia Gigante, que consiste no inóculo da levedura no centro da placa de Petri (90 X 15mm) com auxílio de inoculador de



madeira, em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, posteriormente incubada à 37°C por até 30 dias.

#### **4.3.2.2. Aspectos micromorfológicos - Microcultivo**

O microcultivo das amostras objetivou pesquisar a presença de blastoconídeosporos, artroconídeosporos, pseudo-micélio, micélio verdadeiro e presença de apressório. O microcultivo foi feito em ágar Extrato de malte, em placa de Petri (90 X 15mm) previamente dividida em 2 partes o que permitiu a semeadura de duas amostras na mesma placa. O inóculo foi realizado com alça de níquel cromo sendo semeadas 3 estrias paralelas na superfície do meio que foi posteriormente recoberto com lamínula esterilizada. A placa foi incubada à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por até 10 dias. As estruturas foram observadas em microscópio óptico com objetivas de 10X e 40X (Método de RIVALIER & SEYDEL).

#### **4.3.3. Análise bioquímica**

Foi preparada uma suspensão de leveduras em 4 mL de salina esterilizada com turbidez comparável ao padrão da escala 0,5 de Mac Farland, a partir de colônias previamente semeadas em ágar Sabouraud dextrose, a 37°C por 48 horas.

##### **4.3.3.1. Fermentação de fonte de carbono (Zimograma)**

(Método de VAN DER WALT, 1970)

Alíquotas de 200 $\mu$ L da suspensão do inóculo foram adicionadas, com auxílio de micropipeta, ao tubo de ensaio contendo o meio básico de fermentação, tubo de Durhan e o carboidrato (glicose) a ser testado. Os tubos foram rosqueados frouxamente e incubados a 25°C por 07 dias. Diariamente os tubos eram observados para verificar a produção ou não de gás nos tubos de Durhan.

##### **4.3.3.2. Prova de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Auxanograma, Método de BEIJERINCK, 1889)**

O perfil bioquímico das leveduras também foi caracterizado através de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio. Foram utilizados 18 substratos: galactose, sacarose, lactose, maltose, dextrose (glicose), rhamnose, melibiose, melizitose, eritritol, L-arabinose, D-arabinose, D-manitol, galactiol, myo-inositol

inositol), sorbitol (glucitol), rafinose, ribitol e dulcitol (galactiol). Peptona e nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) foram empregados como fontes de nitrogênio.

#### **4.3.3.3. Detecção da enzima Urease**

As amostras foram inoculadas com auxílio de alça de níquel cromo, em tubo de ensaio contendo ágar Uréia de Christensen e incubadas à 37°C por 7 dias. Os tubos incubados eram verificados diariamente para observar se havia ocorrido hidrólise da uréia com produção de amônia (NH<sub>3</sub>) e CO<sub>2</sub>. A alcalinização pela produção de uréia foi detectada através da viragem de cor do meio, de amarelo para roxo, pela ação do indicador de pH, confirmando teste positivo para urease.

#### **4.4. Análise do padrão de susceptibilidade/resistência à antifúngicos**

Os microrganismos identificados como *Trichosporon* foram testados por microdiluição em caldo, realizado de acordo com a padronização publicada no documento M27-A2 pelo “NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS” (NCCLS, 2002). Leituras dúbias e resultados que apresentaram CIMs (Concentração Inibitória Mínima) de resistência às drogas testadas foram confirmadas por prova de macrodiluição em tubo (NCCLS, 1992) e também pelo método do E-test (COLOMBO et al., 1995).

Além das amostras utilizadas neste estudo, foram incluídas seis amostras padrão CBS das quais eram conhecidas as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para itraconazol, fluconazol, 5-flucitocina e anfotericina B (GUÉHO et al., 1994; WOLF et al., 2001).

##### **4.4.1. Antifúngicos**

Foram testadas seis drogas, anfotericina B (Sigma; A – 4888; Lote: 11K4004), 5-flucitosina (Sigma; F – 7129; Lote: 110K4012), fluconazol (Pfizer Inc., Nova York, N.Y.), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, N.Y.; Lote nº: ZR051211PVA), voriconazol (Pfizer; V Fend® IV; Lote: 304 – KIT 006) e terbinafina - cloridrato (Novartis; Código: 5520; Lote: 1990005004).

#### **4.4.1.1. Preparo da solução estoque de antifúngicos**

A solução-estoque de fluconazol e 5-flucitosina foi obtida em água destilada. Itraconazol foi dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido) e posteriormente aquecido para completa dissolução; anfotericina B, terbinafina, e voriconazol também foram dissolvidas em DMSO. A solução-estoque de 5-flucitosina apresentava concentração de 1000 $\mu$ g/mL enquanto a dos demais antifúngicos, 250 $\mu$ g/mL. As soluções-estoque eram preparadas imediatamente antes do uso e foram mantidas sob refrigeração até o momento da manipulação.

#### **4.4.2. Meio de cultivo**

O meio líquido RPMI-1640 com L-glutamina, 20g/L de glicose (2%), sem bicarbonato de sódio e tamponado com MOPS a pH 7,0 (American Biorganic, Niagara Falls, N.Y.) foi usado na técnica de microdiluição e macrodiluição. Durante todo o experimento, um único lote de RPMI-1640 foi utilizado. Em cada novo ensaio, alíquotas de 2 mL do meio líquido foram incubadas nas mesmas condições do teste, para controle de esterilidade.

#### **4.4.3. Preparação do inóculo**

As amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas à 35°C por 24-48 horas. A suspensão inicial do inóculo foi preparada em 5 mL de salina a 0,85% esterilizada. Após homogeneização da suspensão no agitador de tubos, a concentração do inóculo foi verificada através da aferição da turbidez, empregando o cartão de Wickerham até atingir 3<sup>+</sup> (quando ocorre o desaparecimento das linhas), que corresponde à escala 0,5 de McFarland (NCCLS, 2002). A suspensão foi diluída a 1:50 em caldo RPMI (0,1 mL da suspensão para 4,9 mL de RPMI) para obtenção de  $10^6 \times 1/50 = 2 \times 10^4$  células/mL. Nos tubos da macrodiluição e nos poços da placa de microdiluição, a diluição foi de 1:2, sendo que ao final do experimento, a diluição final atingiu  $2 \times 10^4 \times \frac{1}{2} = 1 \times 10^4$  células/mL.

As colônias secas que apresentavam dificuldades de serem ressuspensas em salina esterilizada foram gentilmente homogeneizadas com auxílio de gral e pistilo previamente esterilizados. A suspensão foi retirada com micropipeta e ponteiros estéreis e transportadas para os tubos de ensaio, para posterior leitura do inóculo.

#### **4.4.4. Diluição em caldo realizada em placa para microdiluição e em tubos de ensaio para macrodiluição (NCCLS)**

A partir da solução-estoque de cada droga, foram preparadas soluções com dez vezes a concentração final desejada, a saber: fluconazol, itraconazol, anfotericina B, terbinafina e voriconazol, 0,03 - 64 $\mu$ g/mL, e 5-flucitosina de 0,125 a 256 $\mu$ g/mL. Para cada droga, a diluição seriada foi realizada da seguinte forma: em 12 tubos de ensaio, nos quais previamente havia sido distribuído 1 mL de meio RPMI, foi adicionado 1mL da solução estoque (ou solução mãe) da droga no primeiro tubo que foi homogeneizado e, em seguida, retirou-se 1 ml deste, que foi passado ao segundo tubo e assim sucessivamente. O volume excedente do último tubo foi utilizado como controle negativo. Em seguida foi adicionado igual volume (1 mL) da suspensão da amostra a ser analisada. Os tubos eram mantidos em estufa a 35°C por até 48 horas.

A microdiluição foi feita em placas plásticas com fundo chato (FALCON; USA), esterilizadas, contendo oito séries identificadas de A a H, cada qual com 12 poços (total - 96 poços). As drogas foram diluídas a 1:5 em RPMI-1640. Alíquotas de 100 $\mu$ L de cada concentração foram dispensadas em seqüência nas placas de microtitulação, com auxílio de pipeta multicanal, de forma a permitir que os poços identificados de um a dez contivessem as diferentes concentrações. As placas foram estocadas a -70°C por período inferior a 30 dias.

Antes de cada experimento, as placas eram retiradas do freezer e mantidas por 30 minutos à 25°C. A solução inicial de inóculo foi preparada conforme procedimento descrito anteriormente. A preparação original de cada microrganismo foi diluída a 1:50 em RPMI-1640. Esta preparação de solução-inóculo (amostras a serem testadas) foi realizada para obtenção do dobro da concentração final desejada, visto que esta foi posteriormente adicionada a igual volume de solução RPMI contendo droga antifúngica. A seguir, volumes de 100 $\mu$ L da solução de inóculo RPMI-1640 foram dispensados nos orifícios da placa de microdiluição contendo 100 $\mu$ L de duas vezes as concentrações finais dos antifúngicos testados.

Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 11 em cada placa de microdiluição foram utilizados como controle positivo, neles sendo dispensados

apenas solução-inóculo. O poço número 12 foi o controle negativo, contendo apenas o meio RPMI-1640.

As placas foram mantidas em estufa a 35°C até 48 horas. No momento da leitura, o crescimento de microrganismos no poço-controle positivo (poço de número 11) foi comparado visualmente ao crescimento verificado nos poços referentes a diferentes concentrações testadas (poços de número 1 a 10). Para a leitura do teste, as placas eram colocadas em suporte contendo espelho, permitindo a observação clara do reverso das mesmas. Em ensaios com os azólicos e terbinafina, a menor concentração capaz de induzir inibição proeminente (em torno de 80%) do crescimento verificado do microrganismo testado, em relação ao poço-controle, foi identificada como a concentração inibitória mínima (CIM) da droga para este microrganismo (NCCLS M27-A2, 2002). Para anfotericina B e 5-flucitosina a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visivelmente detectável. As leituras foram realizadas em 24 e 48 horas, em ambas as técnicas (micro e macrodiluição).

#### **4.4.5. Método do E-test**

O E test foi realizado de acordo com a técnica proposta pelo fabricante (AB BIODISK, 1993) e por Colombo et al. (1995).

O preparo do inóculo seguiu o mesmo procedimento do método do NCCLS. As amostras eram distribuídas homogeneamente em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, com auxílio de “swab” de alginato de cálcio esterilizado, conforme o método de KIRBY-BAUER, segundo recomendações do fabricante (AB BIODISK). Em seguida, empregando pinça previamente flambada, foram depositadas as fitas de E-test no centro da placa, sendo colocadas 2 fitas por placa, em posições invertidas, de forma que a zona de maior concentração das fitas dos antifúngicos estivessem em posição contrária para que não dificultasse ou mesmo impedisse a leitura dos valores de CIM. As fitas de anfotericina B, itraconazol e fluconazol foram depositadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e as fitas de 5-flucitosina em placas de Petri contendo ágar RPMI (usa-se o ágar RPMI porque a peptona presente no agar Sabouraud interfere com a 5-flucitosina). As placas foram incubadas a 35°C por até 48 horas e foram lidos os valores de CIMs com 24 e 48 horas. Não foi realizado E-test com terbinafina e voriconazol.

#### 4.4.6. Análise dos resultados dos testes de susceptibilidade

A distribuição dos valores de CIM para os antifúngicos foi analisada de três formas: 1) variação dos valores, representando os limites inferior e superior das CIMs de cada droga, 2) CIM<sub>50</sub> e 3) CIM<sub>90</sub>, definidas, respectivamente, como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras testadas. Foram comparados os valores de CIMs obtidos em 24 e 48 horas.

Os pontos de corte para fluconazol, itraconazol, 5-flucitosina e anfotericina B sugeridos por Wolf et al. (2001) e para voriconazol pelo NCCLS M-27A, estão relacionados no quadro 2. A análise do perfil de susceptibilidade das amostras padrão CBS foram comparadas com os resultados (quadro 3) apresentados por Guého et al. (1994) e Wolf et al. (2001).

**QUADRO 2** – Pontos de corte de susceptibilidade a fluconazol, itraconazol, 5-flucitosina e anfotericina B ( $\mu\text{g/mL}$ ) (WOLF et al., 2001).

| Fluconazol | Itraconazol  | 5-flucitosina | Anfotericina B | Voriconazol |
|------------|--------------|---------------|----------------|-------------|
| 2 - 8      | $\leq 0,125$ | 8 -16         | $\leq 1$       | $\leq 1$    |

Em relação à terbinafina, usou-se como referência a CIM de 1,4  $\mu\text{g/mL}$  para *Candida albicans*, apresentado por Ryder (1999).

**Quadro 3** – Perfil de susceptibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas obtidos com amostras padrão CBS por Guého<sup>1</sup> et al. (1994) e Wolf<sup>2</sup> et al. (2001).

|                                    | Anfo B                                |                    | 5-FC                               |                  | Flu                                 |                 | Itra                                |                  |
|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|------------------|
|                                    | NCCLS                                 | E-test             | NCCLS                              | E-test           | NCCLS                               | E-test          | NCCLS                               | E-test           |
| <i>T. asahii</i><br>(CBS 2479)     | 0,010 <sup>1</sup> /0,25 <sup>2</sup> | 0,125 <sup>2</sup> | >50 <sup>1</sup> /128 <sup>2</sup> | >32 <sup>2</sup> | 0,015 <sup>1</sup> /16 <sup>2</sup> | 32 <sup>2</sup> | 0,019 <sup>1</sup> /ND <sup>2</sup> | 1,0 <sup>2</sup> |
| <i>T. asteroides</i><br>(CBS 3481) | 0,010 <sup>1</sup>                    |                    | S/C <sup>1</sup>                   |                  | 0,38 <sup>1</sup>                   |                 | 0,010 <sup>1</sup>                  |                  |
| <i>T. inkin</i><br>(CBS 5585)      | 0,010 <sup>1</sup>                    |                    | 12,5 <sup>1</sup>                  |                  | 1,56 <sup>1</sup>                   |                 | 0,019 <sup>1</sup>                  |                  |
| <i>T. mucoides</i><br>(CBS 7625)   | 0,38 <sup>1</sup>                     |                    | 50 <sup>1</sup>                    |                  | 6,25 <sup>1</sup>                   |                 | 0,019 <sup>1</sup>                  |                  |
| <i>T. ovoides</i><br>(CBS 7556)    | 0,078 <sup>1</sup>                    |                    | 50 <sup>1</sup>                    |                  | 6,25 <sup>1</sup>                   |                 | 0,019 <sup>1</sup>                  |                  |

Anfo B = Anfotericina B      5-Fc = 5-Flucitosina      Flu = Fluconazol      Itra = Itraconazol      ND = Não detectado  
 S/C = Sem crescimento

## **4.5. Caracterização genotípica**

A tipagem molecular das espécies de *Trichosporon* analisadas neste estudo foi realizada pela técnica de RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA) e foi utilizado o protocolo recomendado para o gênero *Candida* (WILLIAMS et al., 1990), já testado por Lemes et al. (1998).

### **4.5.1. Amplificação arbitrária de polimorfismos de DNA**

#### **“Randomly amplified polymorphic DNA” (RAPD)**

Foram utilizados iniciadores de 10 pares de base e com conteúdo de G + C de 40 - 60% (WILLIAMS et al., 1990). Os padrões de bandas foram visualizados em géis de agarose corados com brometo de etídio (SAMBROOK et al., 1989).

#### **4.5.1.1. Formação de protoplastos e extração de DNA**

Uma colônia de cada levedura isolada foi semeada em placa de ágar Sabouraud dextrose com 300 mg/L de cloranfenicol e incubada por 48 horas à 35°C. Foi retirada uma única colônia da placa e adicionada em 5 mL de caldo YEPD e incubada *overnight* à 35°C sob agitação e aeração. Foi transferido 1,3mL da cultura para tubo de microcentrifugação de 1,5mL, sendo o mesmo centrifugado à 6.000 rpm por 3 minutos. As células eram lavadas em 1mL de água bidestilada esterilizada e ressuspensas no agitador de tubos.

Após nova centrifugação, seguiu-se a extração do DNA. O sobrenadante foi removido e as células homogeneizadas em 200mL de tampão protoplasto e incubadas por 1 hora à 37°C; 200µL de tampão de lise foram adicionados à suspensão, que posteriormente foi incubada à 65°C por 20 minutos e em seguida resfriada rapidamente no gelo. Para precipitar as proteínas e restos celulares, foram adicionados 200µL de acetato de potássio 5M pH 5,4 ao tubo *ependorff* e incubado no gelo por 15 minutos. A suspensão foi centrifugada em à 6.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo de microcentrifugação. Quando necessário, a centrifugação era repetida. Foi adicionado 0,6 volume de isopropanol ao precipitado, ou seja, para 500µL de centrifugado obtido, eram adicionados 300µL de isopropanol e misturado gentilmente por inversão e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação em velocidade de 7.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante era desprezado sendo 1mL de etanol 70% adicionado ao



precipitado (*pellet*), homogeneizado por inversão e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos e novamente centrifugado por 10 minutos à 6.000 rpm. A lavagem com etanol era repetida, o *pellet* seco por 10 minutos e o DNA dissolvido em 98µL de água bidestilada esterilizada e, em seguida, acrescido de 1µL de Tris HCl 1M pH 7,5.

#### 4.5.1.2. Quantificação do DNA

Foram diluídos 5µL de DNA em 1mL de água destilada esterilizada e a absorbância era medida em 260nm de comprimento de onda em espectrofotometria. O aparelho já aferia a quantidade de DNA e as amostras que apresentaram quantidade de DNA inferior a 2,0µg/mL foram submetidas a nova extração. Todas as amostras cujos DNAs atingiram a quantidade ideal foram diluídas a 60ng/µL.

#### 4.5.1.3. Iniciadores utilizados

Os iniciadores utilizados neste estudo continham entre 40 - 50% de G + C e temperatura de anelamento que variava de 28 a 30°C. Os iniciadores empregados no RAPD estão descritos abaixo com suas respectivas seqüências de bases:

|       |   |   |      |
|-------|---|---|------|
| M3    | (5' – GAG ACA ATG A - 3'),              | } | RAPD |
| M2    | (5' - CTT GAT TGC C - 3'),              |   |      |
| B14   | (5' - GAT CAA GTC C - 3'),              |   |      |
| SOY 5 | (5' – AGG TCA CTG A - 3'),              |   |      |
| OPA 4 | (5' – AAT CGG GCT G - 3'),              |   |      |
| OPA 2 | (5' – TGC CGA GCT G - 3'),              |   |      |
| ITS 1 | (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'),  | } | ITS  |
| ITS 4 | (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'). |   |      |

#### 4.5.1.3.1. Concentração dos iniciadores utilizados

Os iniciadores foram reconstituídos em 1mL de tampão TE esterilizado segundo as recomendações do fabricante (INVITROGEN BRASIL, Custom Primers) e a seguir todos os iniciadores foram diluídos na concentração de 30µg/mL em água Milli-Q esterilizada, para que fossem empregados na reação de PCR.

#### **4.5.1.4. Reação em cadeia da polimerase - PCR**

Para a reação de PCR, foram adicionados em tubos *ependorff* de 0,5mL, 13,0µL de água bidestilada esterilizada; 2,5µL de 10x *buffer* (Promega); 4µL de dNTP mix 1,25mM (Pharmacia); 3,5µL MgCl<sub>2</sub> 25mM; 0,5µL de iniciador; 0,5µL de Taq polimerase (5U/µL - Promega) e 1µL de DNA diluído à 60ng/µL, atingindo um volume total de 25µL. Foram adicionados 30µL de óleo mineral esterilizado para evitar a evaporação durante o tempo de permanência no termociclador. Os tubos de *ependorff* foram colocados no aparelho termociclador PTC- 100™ (Programmable Peltier – Effect Cycling Thermal Controlle – MJ Research, Inc.) programado para 35 ciclos:

94°C - 3 min. (94°C – 1 min; 35°C - 1 min.; 72°C - 2 min.; 35 vezes) → 72°C 10 min. → 4°C ∞.

#### **4.5.1.5. Eletroforese de fragmentos de RAPD**

O gel de agarose para a eletroforese foi usado na concentração de 1,5% em solução tampão TBE 0,5X. Os produtos da reação de PCR foram diluídos em tampão de corrida 6X (10µL da reação em 2 µL do tampão de corrida) e 0,5µL do marcador de peso molecular (Pharmacia Biotech - 100 base pair Ladder) foi diluído em 9,5µL de água Milli-Q esterilizada e 2µL do tampão de corrida. Dez µL da reação diluída foram adicionados a cada orifício do gel, que correu em 80 volts por 15 minutos e em 40 volts por 01:45 horas. O gel foi corado com brometo de etídio por 20 minutos (400mL de TBE + 20µL de brometo de etídio) e fotografado (Polaroid) em luz UV.

#### **4.5.1.6. Avaliação da similaridade genética**

Nesta avaliação, amostras com diferença em número de uma banda, ou tamanho de uma banda no perfil genômico quando comparadas com as amostras CBS foram consideradas com alto grau de similaridade genética, caracterizando o gênero. Foi utilizado o marcador de tamanho molecular de 100 bp Ladder (Pharmacia Biotech) para RAPD como referência do tamanho das bandas.

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. Confirmação do gênero *Trichosporon* nas amostras analisadas através do método clássico.

Dentre as 65 amostras analisadas, 39 foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Trichosporon* através das provas de fermentação da glicose e presença da enzima urease (figura 1). A tabela 1 descreve as amostras que apresentaram teste de fermentação da glicose negativo e positividade na detecção da enzima urease, caracterizando o gênero estudado.

### 5.2. Frequência de isolamento de *Trichosporon* de acordo com o sítio de origem

De acordo com a tabela 2 e figura 2, a maior frequência de isolamento das amostras analisadas do gênero *Trichosporon* ocorreu em urina (35,9%), seguida de mucosa oral (12,8%) e sangue (10,26%). Unha e escama de pele obtiveram 7,70% cada, e os demais sítios (pêlo, lavado broncoalveolar, interdígitos e ambiente) apresentaram a menor taxa percentual de isolamento (2,56%). Seis amostras (15,4%) eram de origem desconhecida.

### 5.3. Identificação das espécies do gênero *Trichosporon* através do Método Clássico

A tabela 3 permite fazer a correlação entre as diferentes provas empregadas no método clássico. Três amostras analisadas (7,7%) não apresentaram nenhuma correlação entre os testes realizados, dezenove (48,7%) apresentaram similaridade apenas entre dois métodos e somente dezessete (43,6%) entre os três. A análise micromorfológica e até mesmo a macromorfologia da colônia gigante se mostraram com maior poder discriminatório que as provas bioquímicas, para as quais *T. asahii* e *T. asteroides* se mostraram com o mesmo perfil. As figuras 3A e 3B mostram respectivamente as características macro e micromorfológicas de *T. asahii*, assim como as figuras 4A e 4B de *T. asteroides*, 5A e 5B de *T. coremiiforme*, 6A e 6B de *T. inkin*, 7A e 7B de *T. mucoides* e 8A e 8B de *T. ovoides*.

As espécies *T. inkiin* (fig. 7B) e *T. ovoides* (fig. 8B), chamaram a atenção por apresentarem em comum uma estrutura conhecida como apressório, cuja função e constituição são ainda desconhecidas. Esta estrutura se difere morfológicamente entre as duas espécies e também quanto à localização. A primeira espécie citada apresenta bifurcações disformes em suas extremidades enquanto a segunda, forma apressório aparentemente semelhante à “couve-flor” ou roseta. *Trichosporon inkiin* a apresenta na porção terminal enquanto *T. ovoides* em posição intercalar. Portanto são as duas únicas espécies que podem ser identificadas fenotipicamente através da micromorfologia.

**Tabela 1** – Caracterização das amostras de *Trichosporon* analisadas através das provas de fermentação de glicose e produção de urease.

| Nº | Código         | Sítio                      | Ferm. Glicose | Urease | Gênero                  |
|----|----------------|----------------------------|---------------|--------|-------------------------|
| 01 | L-099          | Desconhecido               | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 02 | JF-560         | Interdígito                | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 03 | JF-690         | Unha (pés)                 | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 04 | JF-164/98      | Unha                       | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 05 | JF-105         | Unha                       | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 06 | JF-295/00      | Unha                       | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 07 | JF-64          | Escama de pele             | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 08 | R-67           | Ambiente hospitalar (piso) | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 09 | JF-99          | Unha                       | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 10 | JF-578         | Unha (pés)                 | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 11 | 2191           | Urina                      | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 12 | 1575           | Fragmento de músculo       | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 13 | 4045           | Unha                       | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 14 | 151            | Urina                      | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 15 | 286            | Urina                      | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 16 | JP-795         | Pêlo (cabeça)              | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 17 | G-149          | Pêlo (cabeça)              | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 18 | G-1919         | Pêlo (cabeça)              | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 19 | LK-33b         | Mucosa oral                | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 20 | 846            | Sangue                     | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 21 | 845            | Sangue                     | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 22 | Microlife-1707 | Unha                       | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 23 | 28636198       | Urina                      | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 24 | 285-42037      | Urina                      | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 25 | 27622959       | Urina                      | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |

+ = Positivo

- = Negativo

**Cont. tabela 1** – Caracterização das amostras de *Trichosporon* analisadas através das provas de fermentação de glicose e produção de urease.

| Nº | Código             | Sítio                  | Ferm. Glicose | Urease | Gênero                  |
|----|--------------------|------------------------|---------------|--------|-------------------------|
| 26 | T-081              | Urina                  | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 27 | T-082              | Urina                  | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 28 | IAL-60             | Desconhecido           | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 29 | IAL-66             | Desconhecido           | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 30 | IAL-69             | Desconhecido           | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 31 | UFMG-FCIA          | Desconhecido           | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 32 | UFMG               | Ceratite               | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 33 | 022                | Control Lab            | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 34 | 023                | Urina                  | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 35 | 024                | Urina                  | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 36 | 032                | Urina                  | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 37 | 019 <sub>B</sub>   | Lavado bronco-alveolar | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 38 | Bco 48             | Sangue                 | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 39 | Bco 346            | Sangue                 | -             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 40 | Bco 309            | Sangue                 | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 41 | Bco 255            | Sangue                 | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 42 | 72 <sub>c</sub>    | Mucosa oral            | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 43 | 95b <sub>1</sub>   | Mucosa oral            | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 44 | 106b <sub>1c</sub> | Mucosa oral            | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 45 | 22 <sub>c</sub>    | Mucosa oral            | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 46 | 33 <sub>b</sub>    | Mucosa oral            | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |
| 47 | XXIVC <sub>2</sub> | Mucosa oral            | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 48 | 103c <sub>2</sub>  | Mucosa oral            | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 49 | 15 <sub>c</sub>    | Mucosa oral            | -             | +      | <i>Trichosporon sp.</i> |
| 50 | Lemi 1856          | Cateter                | +             | -      | Não <i>Trichosporon</i> |

+ = Positivo

- = Negativo

**Cont. tabela 1** – Caracterização das amostras de *Trichosporon* analisadas através das provas de fermentação de glicose e produção de urease.

| Nº  | Código       | Sítio          | Ferm.<br>Glicose | Urease | Gênero                         |
|-----|--------------|----------------|------------------|--------|--------------------------------|
| 51  | Lemi 1919    | Urina (sonda)  | +                | -      | Não <i>Trichosporon</i>        |
| 52  | Lemi 1920    | Urina (sonda)  | -                | +      | <b><i>Trichosporon sp.</i></b> |
| 53  | 245          | Urina          | +                | -      | Não <i>Trichosporon</i>        |
| 54  | 269          | Urina          | -                | +      | <b><i>Trichosporon sp.</i></b> |
| 55  | 242          | Urina          | -                | +      | <b><i>Trichosporon sp.</i></b> |
| 56  | 243          | Urina          | -                | +      | <b><i>Trichosporon sp.</i></b> |
| 57  | 196          | Urina          | -                | +      | <b><i>Trichosporon sp.</i></b> |
| 58  | 199          | Urina          | +                | -      | Não <i>Trichosporon</i>        |
| 59  | 188          | Urina          | +                | -      | Não <i>Trichosporon</i>        |
| 60  | 30           | Urina          | +                | -      | Não <i>Trichosporon</i>        |
| 61  | 38           | Urina          | +                | -      | Não <i>Trichosporon</i>        |
| 62  | 193          | Urina          | +                | +      | Não <i>Trichosporon</i>        |
| 63  | IAL-47       | Desconhecido   | -                | +      | <b><i>Trichosporon sp.</i></b> |
| 65  | 65/HE-FMIIt  | Escama de pele | -                | +      | <b><i>Trichosporon sp.</i></b> |
| 115 | 115/HE-FMIIt | Escama de pele | -                | +      | <b><i>Trichosporon sp.</i></b> |

+ = Positivo

- = Negativo

HE-UJFJ = Hospital Escola da Universidade Federal de Juiz de Fora

HE-FMIIt = Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Itajubá

Lab. Microlife = Laboratório de Microbiologia Microlife

IAL = Instituto Adolfo Lutz

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

LEMI = Lab. Especial de Micologia



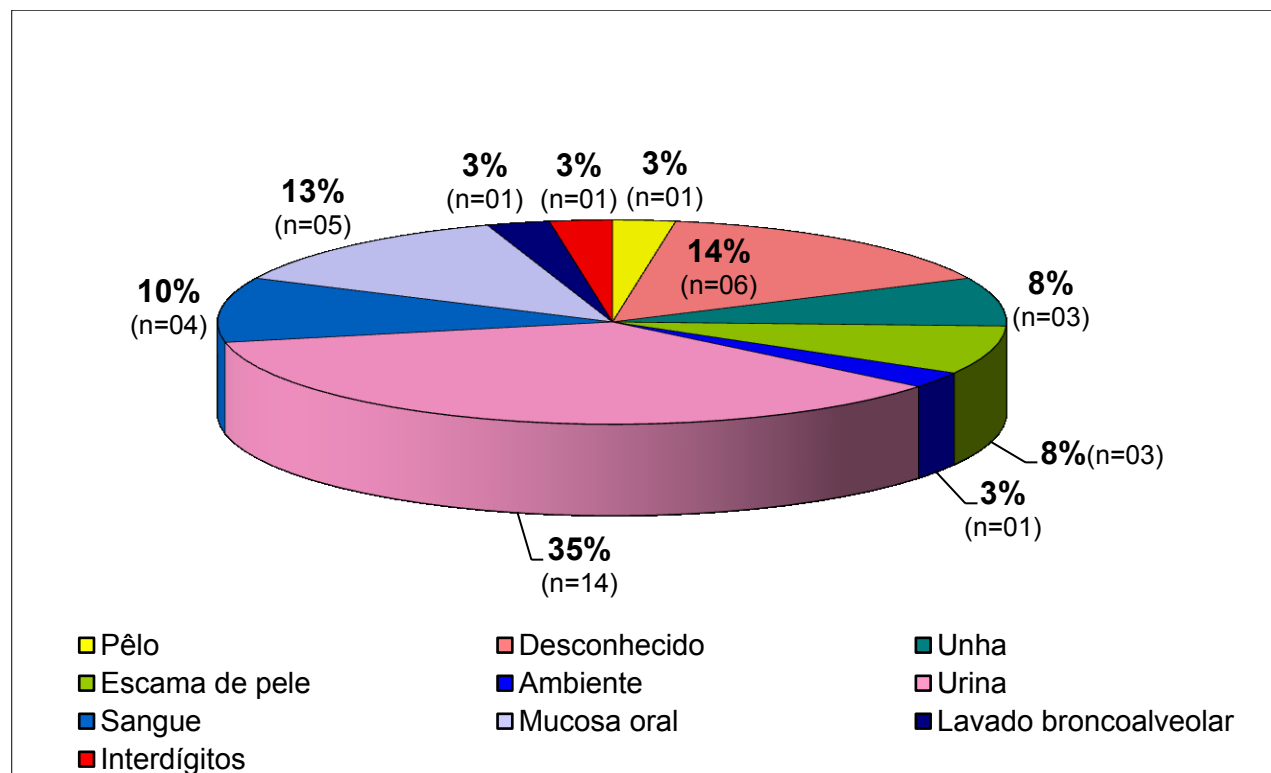
**Figura 1** – Teste de fermentação da glicose e detecção da enzima urease. Os dois tubos da direita caracterizam o gênero *Trichosporon* pela ausência de fermentação da glicose e haver positividade na detecção da enzima urease; os dois tubos da esquerda caracterizam o gênero *Trichosporonoides*, onde há produção de gás no tubo da glicose e positividade da enzima urease.



**Tabela 2-** Distribuição das amostras caracterizadas como gênero *Trichosporon* de acordo com a origem de isolamento.

| <b>Sítios</b>         | <b>N (%)</b>    | <b>Micose</b>   |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Urina                 | 14 (35,90)      | Sistêmica       |
| Mucosa oral           | 05 (12,80)      | Subcutânea      |
| Sangue                | 04 (10,26)      | Sistêmica       |
| Unha                  | 03 (7,70)       | Cutânea         |
| Escama de pele        | 03 (7,70)       | Cutânea         |
| Pêlo                  | 01 (2,56)       | Superficial     |
| Ambiente              | 01 (2,56)       | -               |
| Lavado broncoalveolar | 01 (2,56)       | Sistêmica       |
| Interdígito           | 01 (2,56)       | Cutânea         |
| Desconhecido          | 06 (15,40)      | -               |
| <b>TOTAL</b>          | <b>39 (100)</b> | <b>39 (100)</b> |

**Figura 2** - Distribuição das amostras de *Trichosporon* spp. obtidas de acordo com a origem de isolamento.



### 5.3. Identificação das espécies do gênero *Trichosporon* através do método clássico.

**Tabela 3-** Identificação das espécies do gênero *Trichosporon* através de provas fisiológicas e morfológicas.

| Nº | GALACTOSE | RAFINOSE | SACAROSE | DULCITOL | MELIBIOSE | LACTOSE | D-ARABINOSE | RAMNOSE | RIBITOL | SORBITOL | MELIZITOSE | D-MANITOL | MIO-INOSITOL | L-ARABINOSE | ERITRITOL | Auxanograma<br>ESPÉCIE                     | Microcultivo<br>ESPÉCIE | Colônia<br>gigante<br>ESPÉCIE               |
|----|-----------|----------|----------|----------|-----------|---------|-------------|---------|---------|----------|------------|-----------|--------------|-------------|-----------|--|-------------------------|---|
| 01 | +         | -        | +        | V        | +         | +       | V           | +       | -       | -        | V          | +         | V            | +           | +         | <i>T. faecale</i> /<br><i>T. asahii</i>    | <i>T. asahii</i>        | <i>T. ovoides</i> /<br><i>T. asteroides</i> |
| 02 | +         | +        | +        | -        | +         | +       | -           | +       | -       | +        | V          | +         | +            | +           | +         | <i>T. mucoides</i>                         | <i>T. asteroides</i>    | <i>T. ovoides</i>                           |
| 03 | +         | -        | -        | -        | -         | -       | -           | -       | -       | -        | -          | +         | V            | -           | -         | <i>T. inkin</i>                            | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                            |
| 07 | +         | +        | +        | +        | V         | +       | +           | V       | -       | +        | V          | +         | +            | +           | +         | <i>T. mucoides</i>                         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                            |
| 08 | +         | V        | +        | V        | -         | +       | -           | V       | -       | -        | -          | -         | +            | V           | -         | <i>T. loubieri</i> /<br><i>T. ovoides</i>  | <i>T. ovoides</i>       | <i>T. ovoides</i>                           |
| 13 | +         | +        | +        | +        | +         | +       | -           | +       | +       | +        | +          | +         | +            | +           | +         | <i>T. mucoides</i>                         | <i>T. mucoides</i>      | <i>T. asteroides</i>                        |
| 14 | +         | -        | +        | -        | -         | +       | -           | +       | -       | -        | +          | -         | +            | +           | +         | <i>T. asahii</i>                           | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                            |
| 15 | +         | -        | +        | -        | V         | +       | -           | +       | -       | -        | +          | -         | +            | V           | +         | <i>T. asahii</i>                           | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                            |
| 17 | +         | -        | +        | -        | +         | +       | +           | +       | -       | -        | +          | -         | +            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i> | <i>T. asteroides</i>    | <i>T. asahii</i>                            |
| 20 | +         | +        | +        | +        | V         | +       | -           | -       | -       | +        | V          | +         | +            | +           | +         | <i>T. mucoides</i>                         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                            |
| 21 | +         | +        | +        | +        | V         | +       | -           | -       | -       | +        | V          | +         | +            | +           | +         | <i>T. mucoides</i>                         | <i>T. mucoides</i>      | <i>T. asahii</i>                            |

(-) = Negativo

(+) = Positivo

V = Variável

**Cont. tabela 3-** Identificação das espécies do gênero *Trichosporon* através de provas fisiológicas e morfológicas.

| Nº | GALACTOSE | RAFINOSE | SACAROSE | DULCITOL | MELIBIOSE | LACTOSE | D-ARABINOSE | RAMNOSE | RIBITOL | SORBITOL | MELIZITOSE | D-MANITOL | MIO-INOSITOL | L-ARABINOSE | ERITRITOL | Auxanograma<br>ESPÉCIE   | Microcultivo<br>ESPÉCIE | Colônia<br>gigante<br>ESPÉCIE |
|----|-----------|----------|----------|----------|-----------|---------|-------------|---------|---------|----------|------------|-----------|--------------|-------------|-----------|--|-------------------------|-------------------------------|
| 22 | +         | -        | +        | -        | -         | +       | -           | V       | -       | -        | V          | +         | V            | V           | -         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i>                             | <i>T. asahii</i>        | ND                            |
| 23 | +         | -        | +        | +        | V         | +       | +           | +       | -       | -        | V          | -         | V            | +           | +         | <i>T. faecale</i> /<br><i>T. coremiiforme</i>                          | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>              |
| 25 | +         | -        | +        | -        | V         | +       | V           | V       | -       | -        | -          | V         | +            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i> /<br><i>T. ovoides</i>      | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asteroides</i>          |
| 26 | +         | -        | +        | -        | +         | +       | +           | +       | -       | -        | V          | -         | +            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i>                             | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asteroides</i>          |
| 27 | +         | -        | +        | -        | V         | +       | -           | +       | -       | -        | V          | +         | +            | V           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i>                             | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>              |
| 28 | +         | -        | +        | -        | +         | +       | -           | +       | -       | +        | +          | -         | +            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i> /<br><i>T. coremiiforme</i> | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>              |

(-) = Negativo

(+) = Positivo

V = Variável

ND = Nenhuma das seis espécies analisadas

**Cont. tabela 3-** Identificação das espécies do gênero *Trichosporon* através de provas fisiológicas e morfológicas.

| Nº | GALACTOSE | RAFINOSE | SACAROSE | DULCITOL | MELIBIOSE | LACTOSE | D-ARABINOSE | RAMNOSE | RIBITOL | SORBITOL | MELIZITOSE | D-MANITOL | MIO-INOSITOL | L-ARABINOSE | ERITRITOL | Auxanograma<br>ESPÉCIE  | Microcultivo<br>ESPÉCIE | Colônia<br>gigante<br>ESPÉCIE           |
|----|-----------|----------|----------|----------|-----------|---------|-------------|---------|---------|----------|------------|-----------|--------------|-------------|-----------|---|-------------------------|---|
| 29 | +         | -        | +        | -        | V         | +       | -           | +       | -       | -        | +          | -         | V            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i> /<br><i>T. ovoides</i> | <i>T. asahii</i>        | <i>T. ovoides</i> /<br><i>T. asahii</i> |
| 30 | +         | -        | +        | -        | -         | +       | -           | +       | +       | +        | +          | -         | -            | +           | +         | <i>T. coremiiforme</i> /<br><i>T. asahii</i>                      | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                        |
| 31 | +         | +        | +        | -        | V         | +       | +           | +       | -       | V        | V          | -         | V            | V           | +         | <i>T. ovoides</i> /<br><i>T. mucoides</i>                         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                        |
| 34 | +         | -        | +        | -        | -         | +       | +           | +       | -       | V        | -          | +         | V            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i>                        | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                        |
| 35 | +         | -        | +        | +        | V         | +       | -           | +       | -       | V        | +          | -         | V            | +           | +         | <i>T. coremiiforme</i>  | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                        |
| 36 | +         | -        | +        | -        | +         | +       | +           | +       | -       | -        | V          | -         | +            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i>                        | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>                        |
| 37 | +         | -        | +        | -        | +         | +       | -           | +       | +       | -        | -          | -         | -            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i>                        | <i>T. asteroides</i>    | <i>T. asahii</i>                        |

(-) = Negativo

(+) = Positivo

V = Variável

**Cont. tabela 3-** Identificação das espécies do gênero *Trichosporon* através de provas fisiológicas e morfológicas.

| Nº | GALACTOSE | RAFINOSE | SACAROSE | DULCITOL | MELIBIOSE | LACTOSE | D-ARABINOSE | RAMNOSE | RIBITOL | SORBITOL | MELIZITOSE | D-MANITOL | MIO-INOSITOL | L-ARABINOSE | ERITRITOL | Auxanograma<br>ESPÉCIE  | Microcultivo<br>ESPÉCIE | Colônia gigante<br>ESPÉCIE |
|----|-----------|----------|----------|----------|-----------|---------|-------------|---------|---------|----------|------------|-----------|--------------|-------------|-----------|---|-------------------------|----------------------------|
| 40 | +         | -        | +        | -        | V         | -       | -           | -       | -       | -        | +          | +         | +            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i>                        | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>           |
| 41 | +         | -        | +        | -        | -         | -       | -           | +       | +       | -        | +          | +         | -            | -           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i> /<br><i>T. faecale</i> | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>           |
| 42 | +         | -        | +        | -        | V         | +       | -           | V       | +       | V        | V          | +         | +            | V           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i> /<br><i>T. faecale</i> | <i>T. asteroides</i>    | <i>T. asteroides</i>       |
| 44 | +         | -        | +        | +        | -         | +       | -           | +       | +       | +        | V          | +         | +            | V           | +         | <i>T. coremiiforme</i> /<br><i>T. mucoides</i>                    | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>           |
| 47 | +         | +        | +        | +        | V         | +       | -           | V       | -       | V        | V          | -         | V            | V           | +         | <i>T. mucoides</i>  | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>           |
| 48 | +         | +        | +        | +        | V         | +       | -           | +       | -       | V        | +          | -         | -            | +           | +         | <i>T. mucoides</i>  | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>           |
| 49 | +         | -        | +        | -        | V         | +       | -           | +       | +       | V        | +          | -         | V            | V           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i>                        | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>           |

(-) = Negativo

(+) = Positivo

V = Variável

**Cont. tabela 3-** Identificação das espécies do gênero *Trichosporon* através de provas fisiológicas e morfológicas.

| Nº  | GALACTOSE | RAFINOSE | SACAROSE | DULCITOL | MELIBIOSE | LACTOSE | D-ARABINOSE | RAMNOSE | RIBITOL | SORBITOL | MELZITOSE | D-MANITOL | MIO-INOSITOL | L-ARABINOSE | ERITRITOL | Auxanograma<br>ESPÉCIE                     | Microcultivo<br>ESPÉCIE | Colônia<br>gigante<br>ESPÉCIE |
|-----|-----------|----------|----------|----------|-----------|---------|-------------|---------|---------|----------|-----------|-----------|--------------|-------------|-----------|--|-------------------------|-------------------------------|
| 52  | +         | -        | +        | +        | +         | +       | -           | +       | -       | -        | -         | -         | +            | +           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i> | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>              |
| 54  | +         | -        | +        | -        | -         | +       | -           | -       | -       | -        | -         | -         | -            | -           | +         | <i>T. inkin</i>                            | ND                      | <i>T. asahii</i>              |
| 55  | +         | -        | +        | +        | -         | +       | -           | -       | -       | +        | +         | -         | V            | +           | +         | <i>T. coremiiforme</i>                     | <i>T. asahii</i>        | <i>T. ovoides</i>             |
| 56  | +         | -        | +        | -        | -         | +       | -           | -       | -       | -        | +         | +         | -            | +           | +         | <i>T. inkin</i>                            | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>              |
| 57  | +         | -        | +        | -        | -         | -       | -           | -       | -       | V        | +         | +         | -            | V           | +         | <i>T. inkin</i> /<br><i>T. asahii</i>      | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>              |
| 63  | +         | -        | +        | -        | V         | +       | -           | -       | -       | +        | -         | -         | V            | V           | +         | <i>T. asahii</i> /<br><i>T. asteroides</i> | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>              |
| 65  | +         | +        | +        | +        | -         | +       | -           | -       | -       | -        | +         | -         | V            | +           | +         | <i>T. inkin</i>                            | <i>T. ovoides</i>       | <i>T. ovoides</i>             |
| 115 | +         | +        | +        | +        | +         | +       | -           | +       | -       | +        | +         | +         | V            | +           | +         | <i>T. mucoides</i>                         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>              |

( - ) = Negativo

( + ) = Positivo

V = Variável

ND = Nenhuma das seis espécies analisadas

As figuras “A” permitem a caracterização macromorfológica das culturas das amostras que foram obtidas em ágar Sabouraud com cloranfenicol e incubadas a 37°C por até 30 dias. As figuras “B” foram obtidas pelo cultivo das amostras em agar extrato de malte e incubadas à temperatura ambiente (25°C) por até 10 dias e possibilitaram a caracterização micromorfológica.

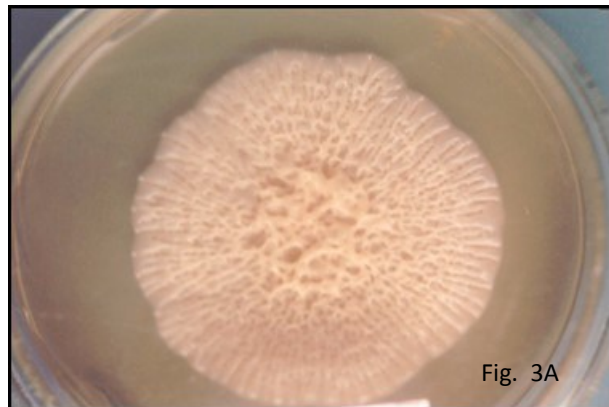


Fig. 3A



Fig. 3B

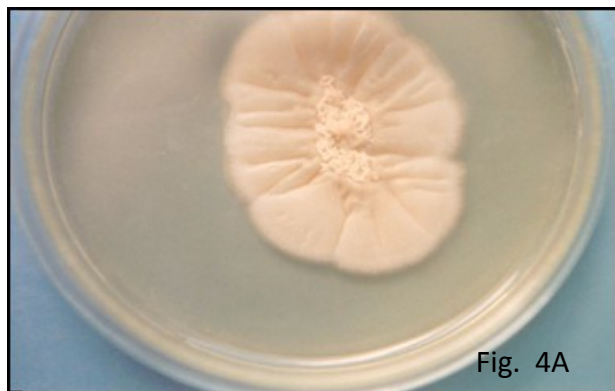


Fig. 4A

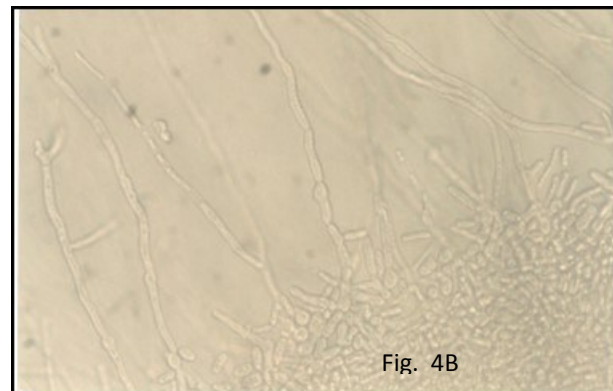


Fig. 4B

Fig. 3A = Macromorfologia de *T. asahii*

Fig. 3B = Micromorfologia de *T. asahii*

Fig. 4A = Macromorfologia de *T. asteroides*

Fig. 4B = Micromorfologia de *T. asteroides*





Fig. 5A

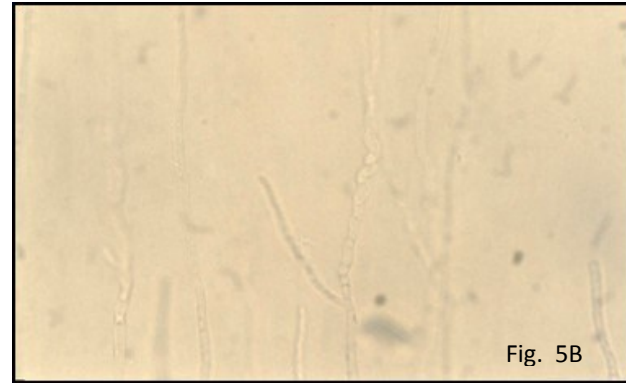


Fig. 5B

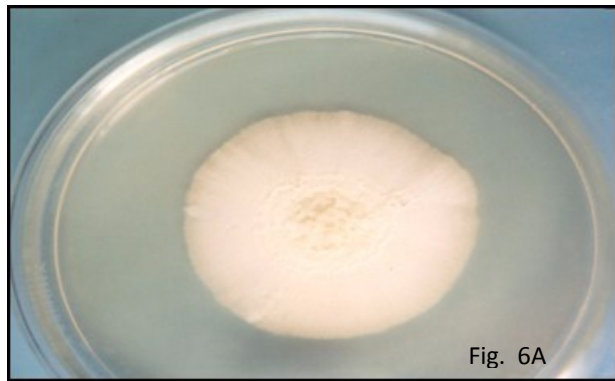


Fig. 6A

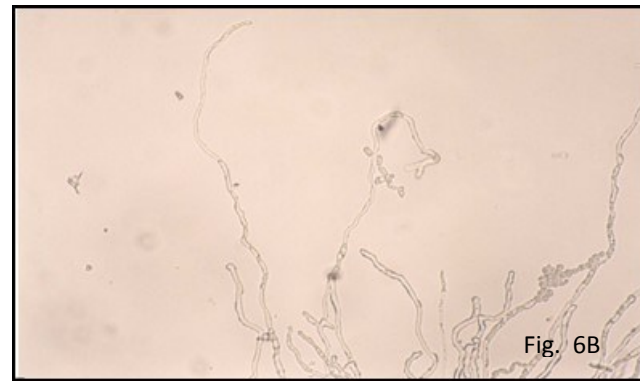


Fig. 6B

Fig. 5A = Macromorfologia de *T. coremiiforme*

Fig. 5B = Micromologia de *T. coremiiforme*

Fig. 6A = Macromorfologia de *T. inkin*

Fig. 6B = Micromologia de *T. inkin*

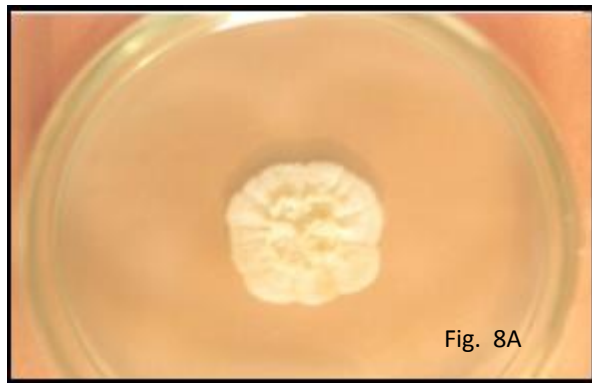
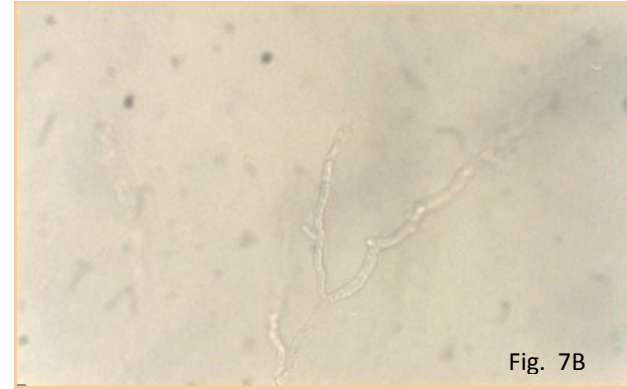
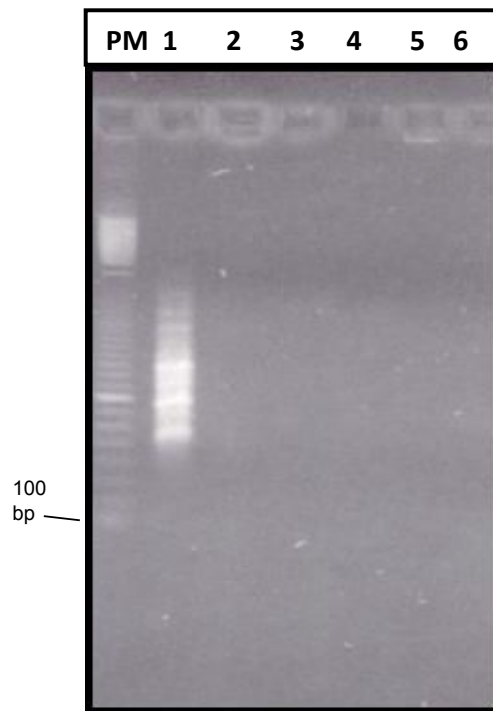


Fig. 7A = Macromorfologia de *T. mucoides*  
Fig. 8A = Macromorfologia de *T. ovoides*

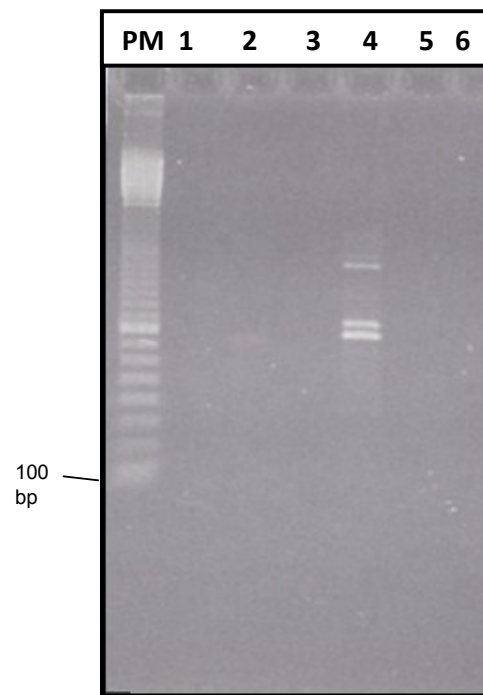
Fig. 7B = Micromorfologia de *T. mucoides*  
Fig. 8B = Micromorfologia de *T. ovoides*

#### 5.4. Seleção dos iniciadores através da temperatura.

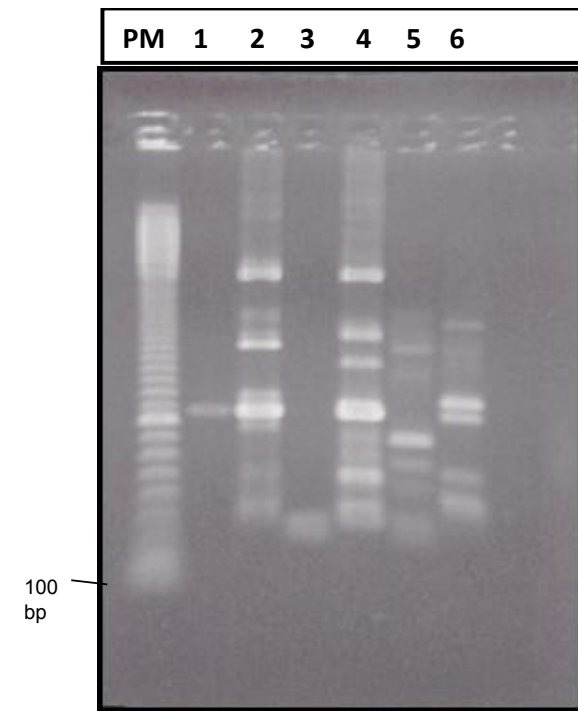
Os iniciadores empregados neste experimento foram oligonucleotídeos de 10 pares de base com temperatura de anelamento máxima de 35°C (dados fornecidos pelo fabricante, INVITROGEN BRASIL CUSTOM PRIMERS). Após a reação de PCR com as amostras padrão CBS, as amostras foram corridas em gel de agarose, com duas temperaturas diferentes (40°C e 35°C) com seis iniciadores. Na reação a 40°C, os iniciadores M2 (fig. 9) e M3 (fig. 10) amplificaram apenas uma espécie (M2, *T. asahii* e M3, *T. inkin*); o B14 (fig. 11) não amplificou *T. asahii* e *T. coremiiforme* assim como SOY-5 (fig. 12). OPA2 (fig. 13) produziu maior número de bandas que OPA4 (fig. 14) para todas as espécies. A reação realizada a 35°C permitiu observar que o iniciador M2 (fig. 15; tab. 4D), embora tenha amplificado todas as espécies, não apresentou poder discriminatório entre as mesmas e produziu pequeno número de bandas em *T. coremiiforme*. O iniciador M3 (fig. 16; tab. 4F) amplificou apenas *T. inkin*, *T. asteroides* e *T. asahii* e produziu pequeno número de bandas. SOY-5 (fig. 17; tab. 4E) não amplificou *T. coremiiforme* e produziu pequeno número de bandas com as outras espécies. Os iniciadores B14 (fig. 20; tab. 4C) e OPA4 (fig. 18; tab. 4B) embora tenham produzido grande número de bandas, não apresentaram o mesmo poder discriminatório que OPA2 (fig. 19). As reações a 35°C produziram maior número de bandas do que a 40°C para todas as espécies testadas com todos os iniciadores sendo, portanto, a temperatura de eleição para as reações com as amostras a serem identificadas genotipicamente com o auxílio do iniciador OPA2 sendo, portanto, este o iniciador selecionado para a caracterização das espécies de *Trichosporon* das amostras analisadas.



**Fig. 9 M2**



**Fig. 10 M3**



**Fig. 11 B14**

**Figuras 9, 10 e 11** – Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com inicializador M2, M3 e B14, resp.ectivamente, em reação de RAPD a 40°C. Canaleta 1, *T. asahii* (CBS 2479); canaleta 2, *T. asteroides* (CBS 3481); canaleta 3, *T. coremiiforme*(CBS 2482); canaleta 4, *T. inkin* (CBS 5585); canaleta 5, *T. mucooides* (CBS 7625); canaleta 6, *T. ovoides* (CBS 7556) e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).

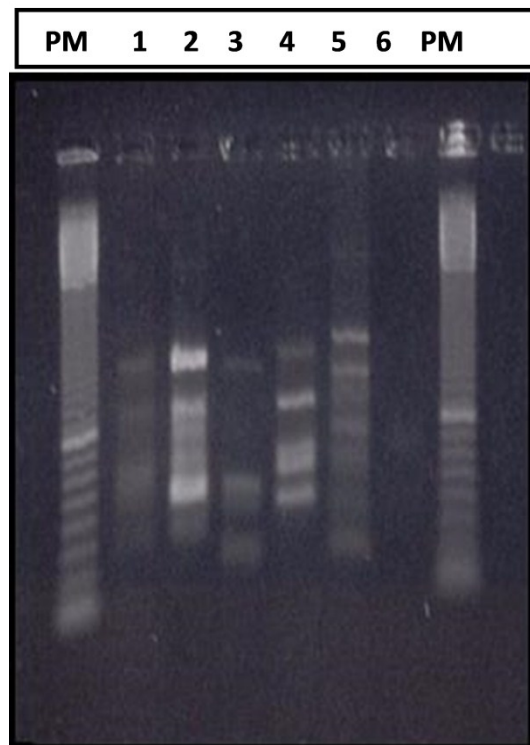


Fig. 12 – SOY

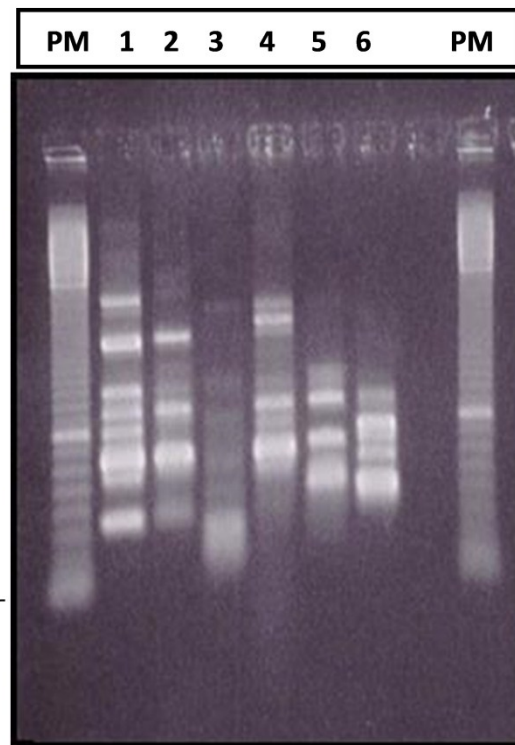


Fig. 13 - OPA2

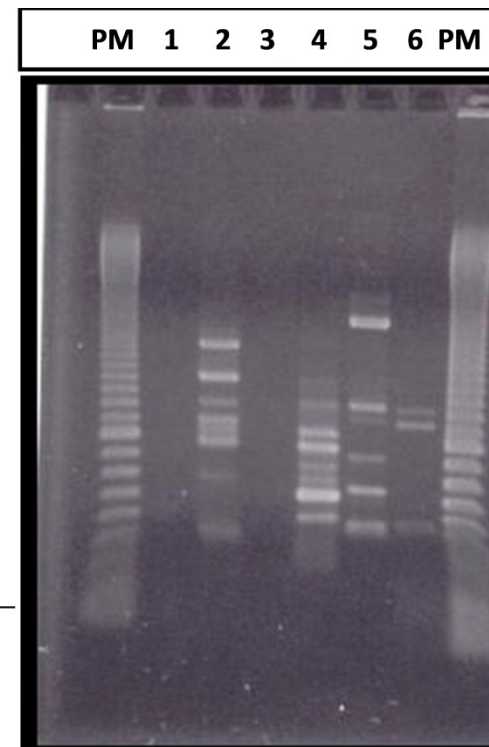


Fig. 14 - OPA4

**Figuras 12, 13 e 14** - Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com inicializador SOY 5, OPA2 e OPA4, resp.ectivamente, em reação de RAPD a 40°C. Canaleta 1, *T. asahii* (CBS 2479); canaleta 2, *T. asteroides* (CBS 3481); canaleta 3, *T. coremiiforme*(CBS 2482); canaleta 4, *T. inkin* (CBS 5585); canaleta 5, *T. mucoides* (CBS 7625); canaleta 6, *T. ovoides* (CBS 7556) e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).

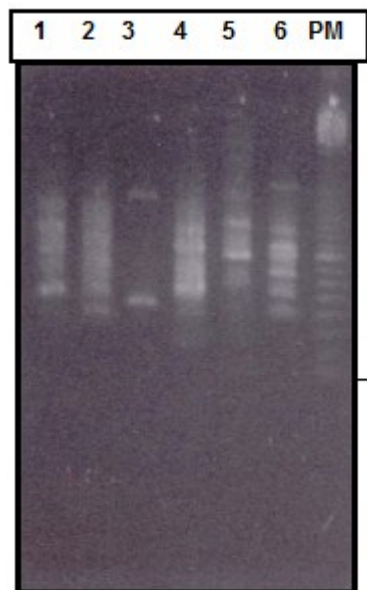


Fig. 15 - M2

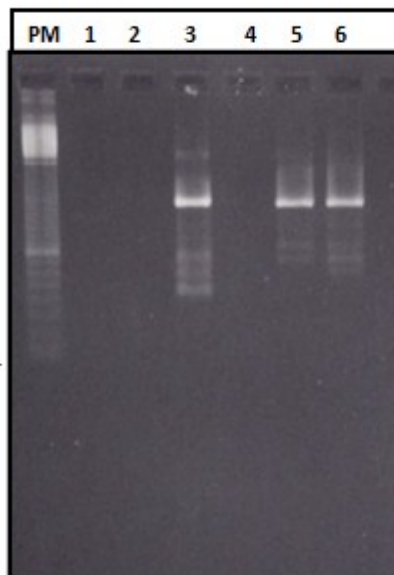


Fig. 16 - M3

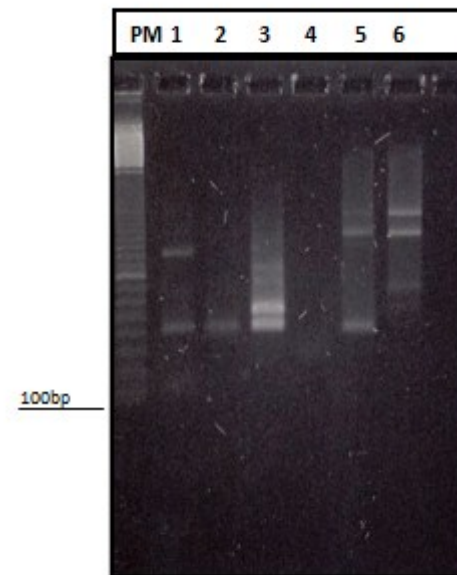


Fig. 17 - SOY 5

**Figuras 15, 16 e 17** - Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com inicializador M2, M3 e SOY 5, respectivamente, em reação de “RAPD” a 35°C. Canaleta 1, *T. ovoides* (CBS 7556); canaleta 2, *T. mucoides* (CBS 7625); canaleta 3, *T. inkin* (CBS 5585); canaleta 4, *T. coremiiforme*(CBS 2482); canaleta 5, *T. asteroides* (CBS 3481; canaleta 6, *T. asahii* (CBS 2479) e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).



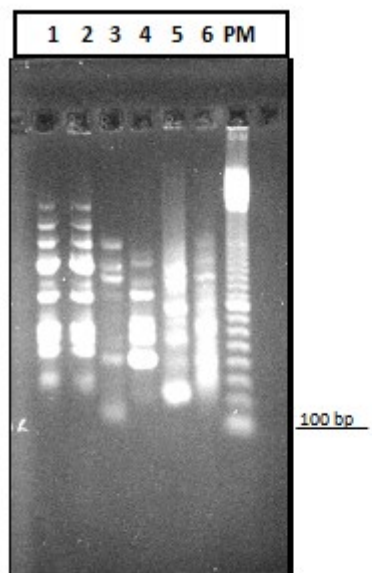


Fig. 18 – OPA4

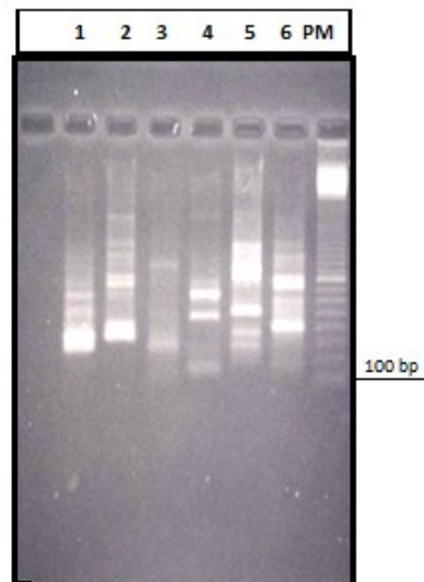


Fig. 19 - OPA2

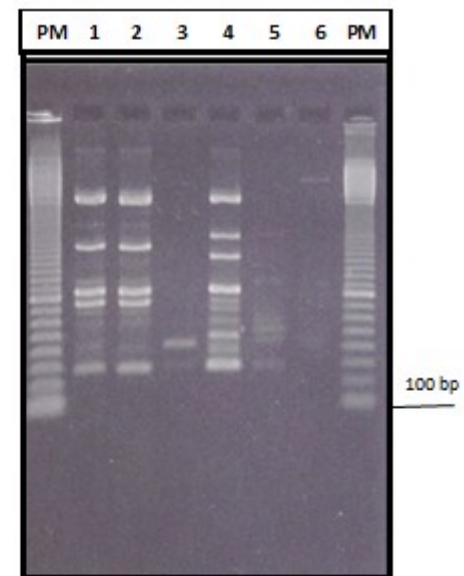


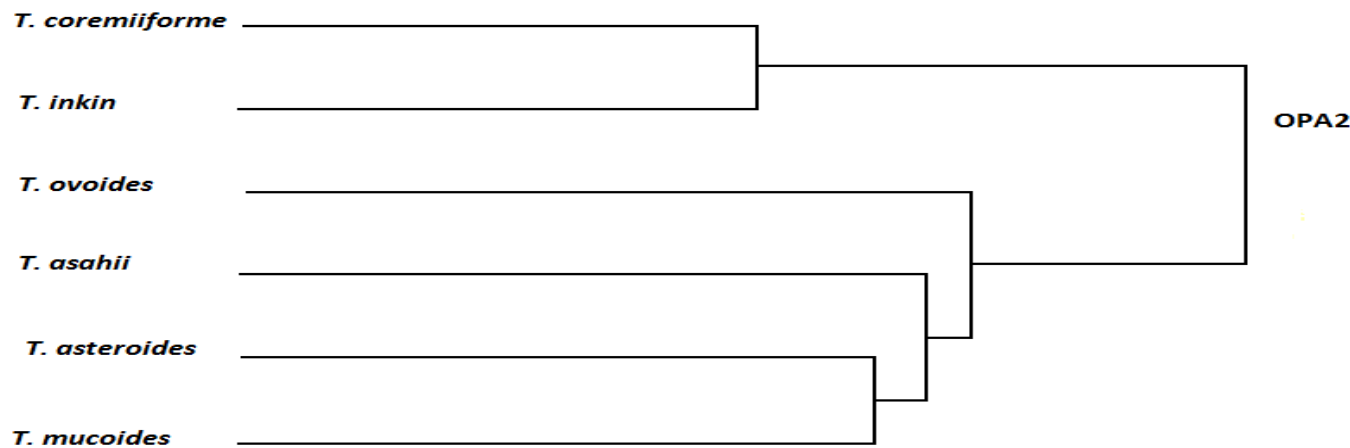
Fig. 20 - B14

**Figuras 18, 19 e 20** - Gel de eletroforese em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com inicializador OPA 4, OPA 2 e B14, respectivamente, em reação de “RAPD” a 35°C. Canaleta 1, *T. asahii* (CBS 2479); canaleta 2, *T. asteroides* (CBS 3481); canaleta 3, *T. coremiiforme*(CBS 2482); canaleta 4, *T. inkin* (CBS 5585); canaleta 5, *T. mucoides* (CBS 7625); canaleta 6, *T. ovoides* (CBS 7556) e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).

**Tabela 4** - Distribuição e Tamanho Estimado dos pares de base das amostras de *Trichosporon* spp. com os oligonucleotídeos OPA2 (A), OPA4 (B), B14 (C), M2 (4D), SOY-5 (4E) e M3 (4F).

**4A - OPA2**

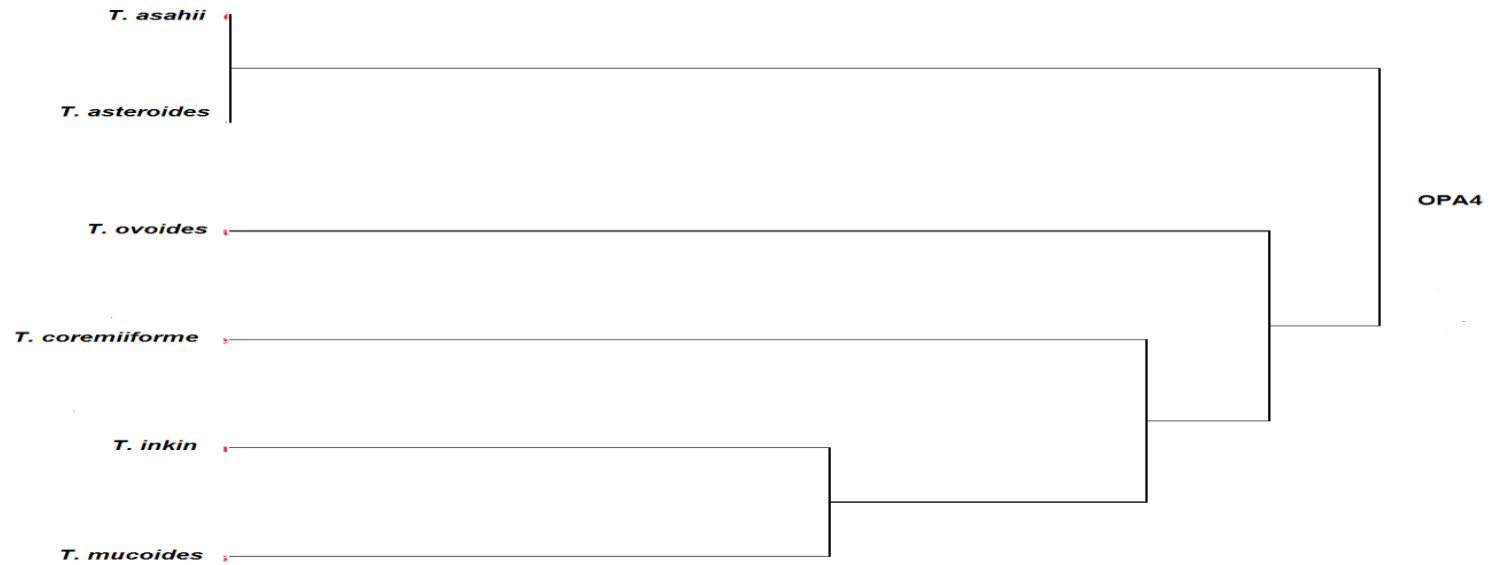
| bp                     | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 | 400 | 450 | 500 | 600 | 700 | 750 | 800 | 900 | 1000 | 1100 | 1200 | 1300 | 1400 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>T. asahii</i>       | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. asteroides</i>   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| <i>T. coremiiforme</i> | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. inkin</i>        | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| <i>T. mucoides</i>     | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    |
| <i>T. ovoides</i>      | 0   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    |





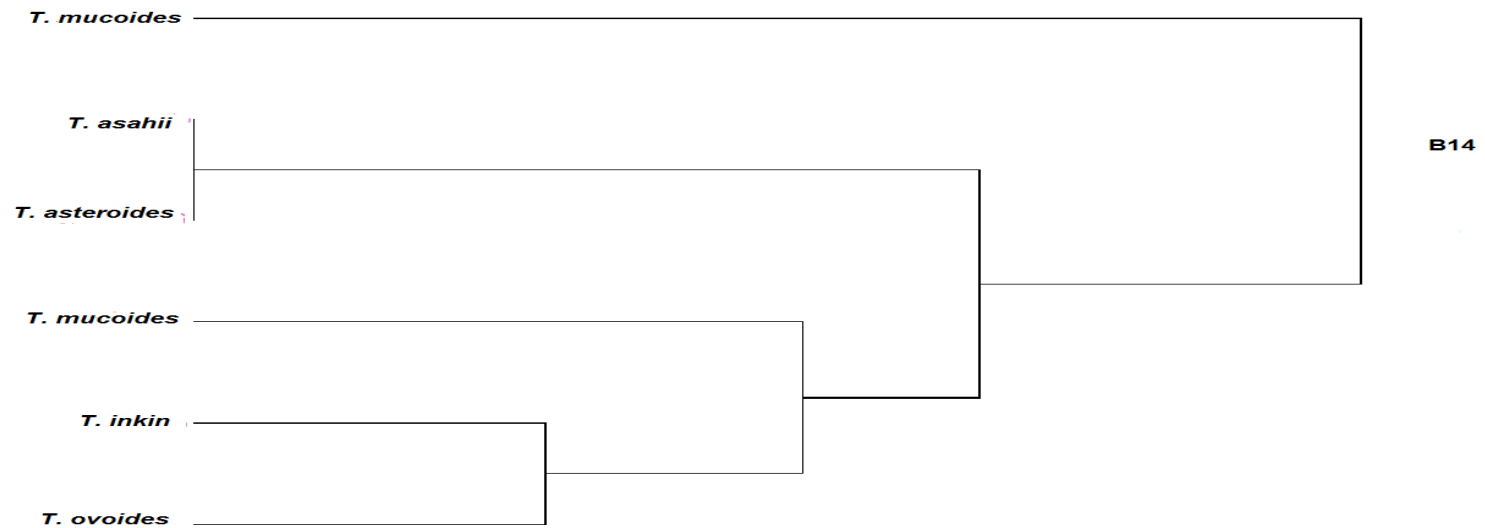
4B - OPA4

| bp                     | 150 | 200 | 300 | 400 | 500 | 550 | 600 | 650 | 700 | 800 | 900 | 1000 | 1100 | 1200 | 1300 | 1400 | 1500 | 1600 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>T. asahii</i>       | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |
| <i>T. asteroides</i>   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |
| <i>T. coremiiforme</i> | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    |
| <i>T. inkin</i>        | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. mucoides</i>     | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. ovoides</i>      | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |



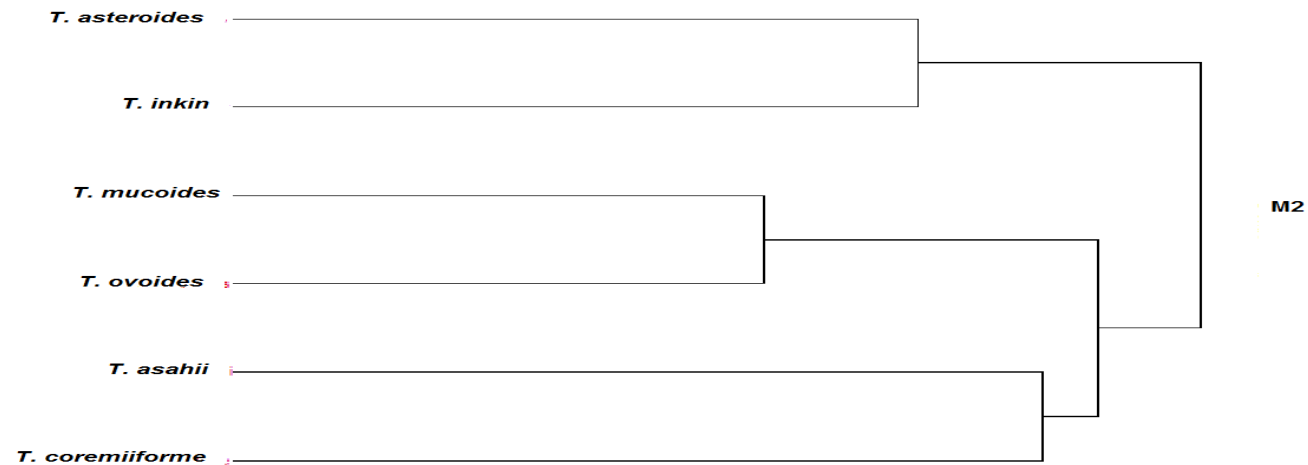
4C - B14

| bp                     | 300 | 350 | 400 | 450 | 500 | 600 | 700 | 750 | 850 | 1000 | 1250 | 1400 | 1600 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| <i>T. asahii</i>       | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1    | 0    | 1    | 1    |
| <i>T. asteroides</i>   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1    | 0    | 1    | 1    |
| <i>T. coremiiforme</i> | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. inkin</i>        | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. mucoides</i>     | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 1    | 0    | 1    |
| <i>T. ovoides</i>      | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    |



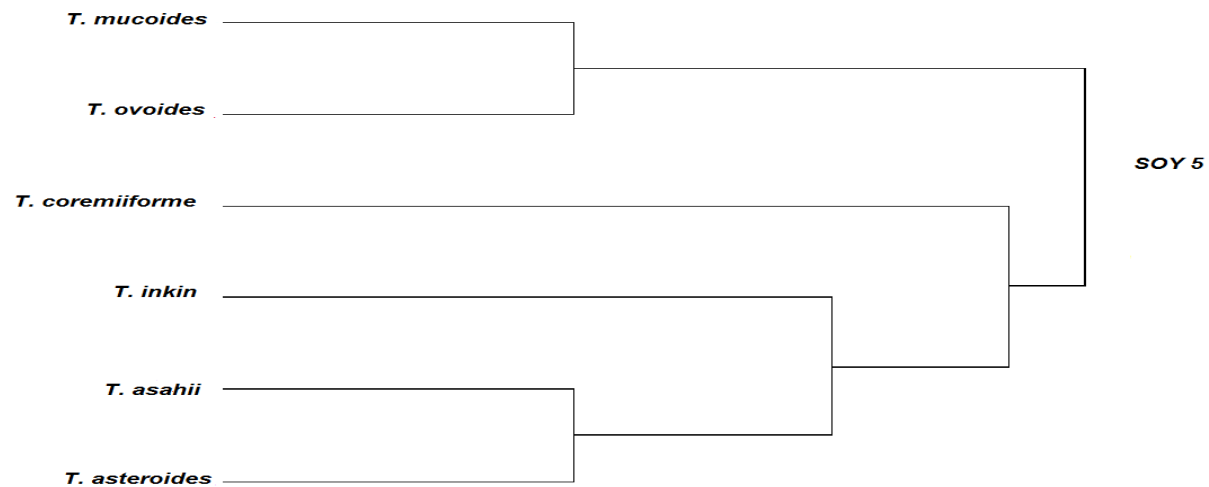
4D - M2

| bp                     | 250 | 400 | 450 | 550 | 650 | 700 | 750 | 800 | 850 | 900 | 1000 | 1100 | 1200 | 1300 | 1400 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>T. asahii</i>       | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    |
| <i>T. asteroides</i>   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    |
| <i>T. coremiiforme</i> | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. inkin</i>        | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>T. mucoides</i>     | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    |
| <i>T. ovoides</i>      | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    |



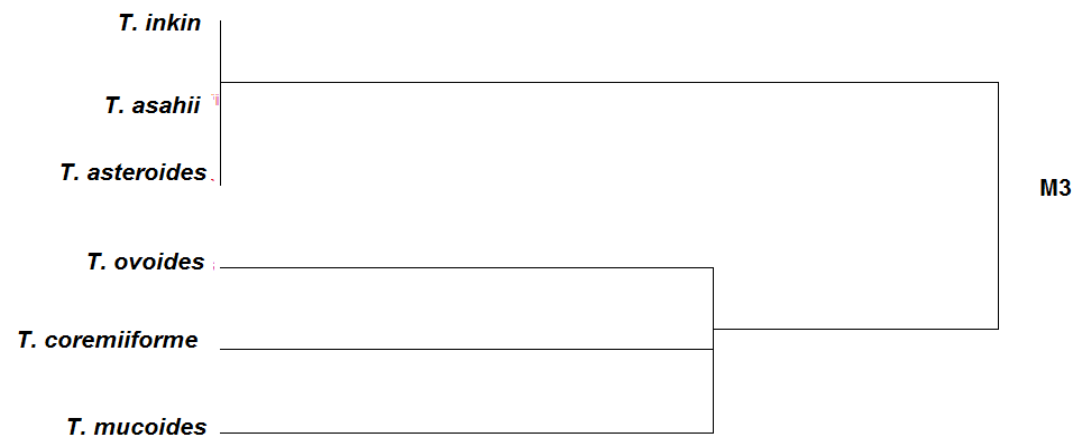
4 E - SOY -5

| bp                     | 250 | 400 | 500 | 650 | 750 | 850 | 1000 | 1300 | 1400 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| <b>Espèce</b>          |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
| <i>T. asahii</i>       | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1    | 0    | 0    |
| <i>T. asteroides</i>   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. coremiiforme</i> | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. inkin</i>        | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0    |
| <i>T. mucoides</i>     | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 1    | 1    |
| <i>T. ovoides</i>      | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0    | 1    | 1    |



4F- M3

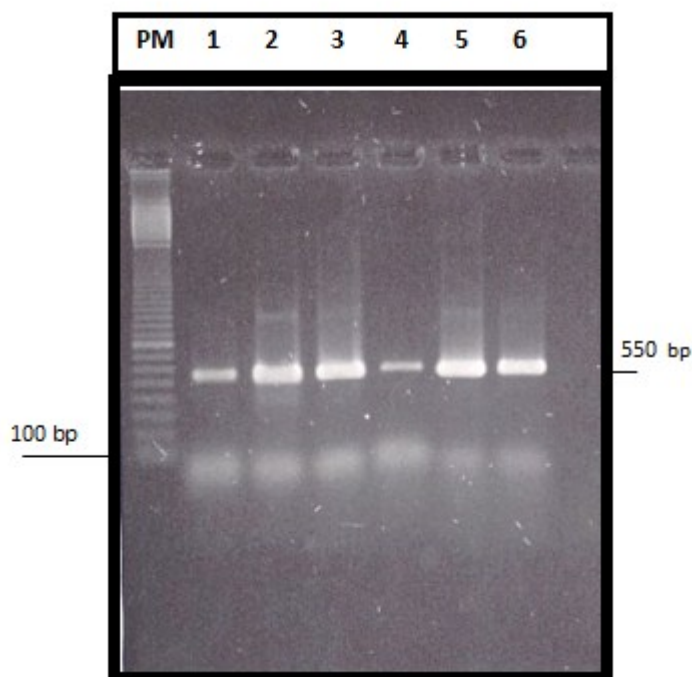
| bp                     | 450 | 600 | 800 | 900 | 1200 | 1400 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|
| <b>Espécie</b>         |     |     |     |     |      |      |
| <i>T. asahii</i>       | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |
| <i>T. asteroides</i>   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |
| <i>T. coremiiforme</i> | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 1    |
| <i>T. inkin</i>        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    |
| <i>T. mucooides</i>    | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 1    |
| <i>T. ovoides</i>      | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1    |



## **5.5. Identificação genotípica do gênero *Trichosporon* através da região ITS.**

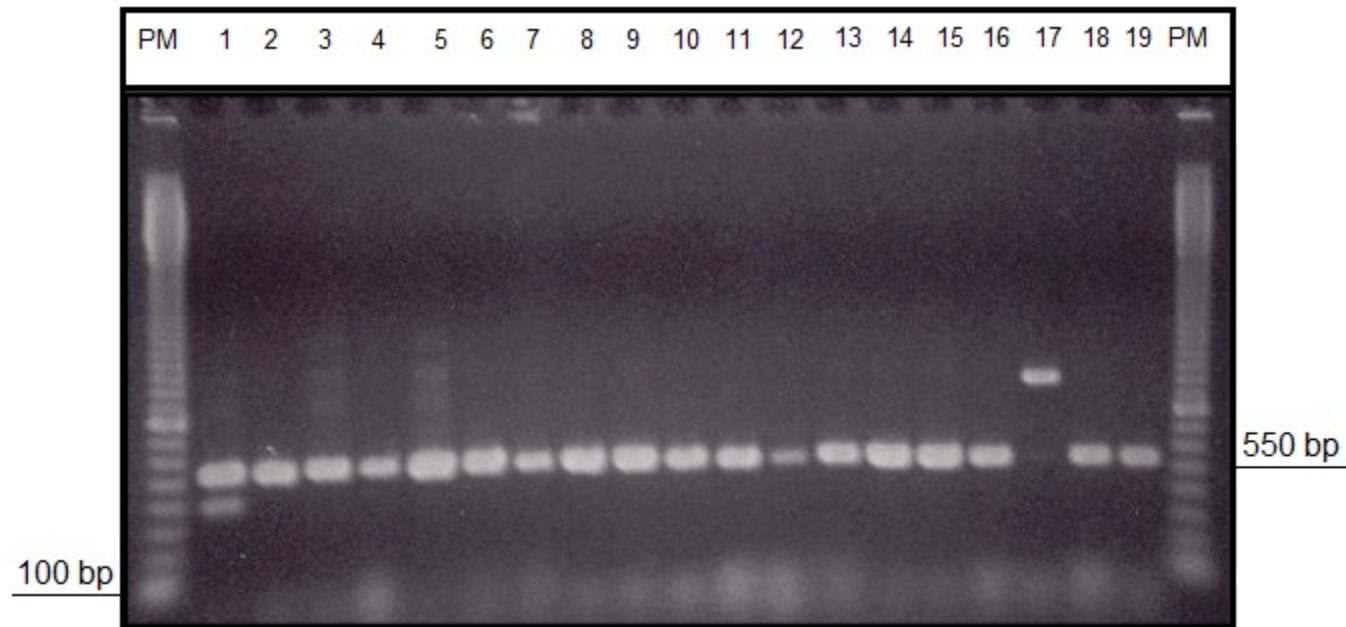
Empregou-se neste experimento os iniciadores ITS1 e ITS2 (fig. 21) com as amostras padrão CBS e obteve-se fragmentos de 550 pares de base para todas as espécies (*T. asahii*, *T. asteroides*, *T. coremiiforme*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides*), o que permitiu a caracterização do gênero através da região ITS. A reação foi realizada com todas as amostras analisadas para a caracterização genotípica do gênero. As figuras 22 e 23 permitem a observação dos fragmentos de 550 pares de base produzidos pelas amostras, com exceção das amostras números T-01, T-28 (fig. 22) e T-54 (fig. 23), que foram excluídas dos experimentos posteriores por não se enquadrarem no perfil genotípico das demais amostras caracterizadas como pertencentes ao gênero *Trichosporon*. Não se obteve sucesso na extração do DNA das amostras T-49 e T-52 (fig. 23), não sendo, portanto, incluídas no restante dos experimentos.

### 5.5. Identificação genotípica do gênero *Trichosporon* das amostras padrão CBS através da região ITS (Fig. 21).



**Figura 21** – Gel em agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras CBS com iniciadores ITS1 e ITS2. Canaleta 1, *T. asahii* (CBS 2479); canaleta 2, *T. asteroides* (CBS 3481); canaleta 3, *T. asahii* var. *coremiiforme*(CBS 2482); canaleta 4, *T. inkin* (CBS 5585); canaleta 5, *T. mucoides* (CBS 7625); canaleta 6, *T. ovoides* (CBS 7556) e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).

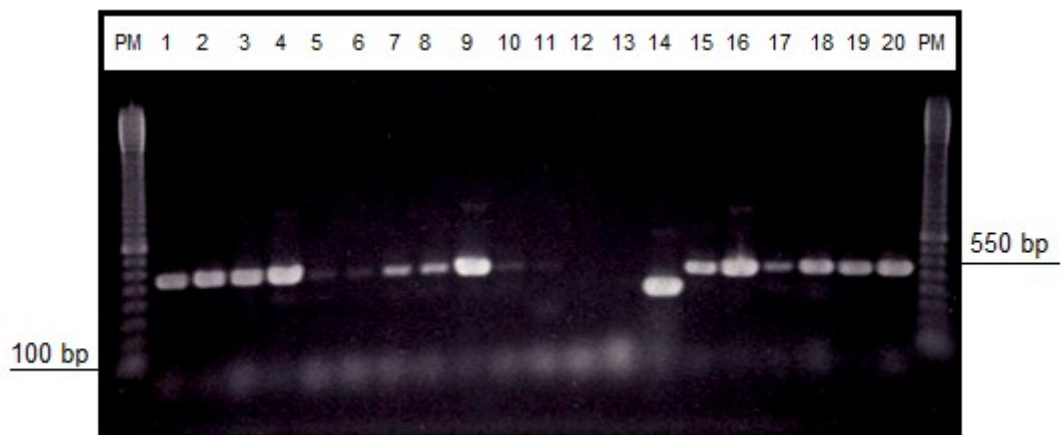
**5.5.1.** Identificação genotípica do gênero *Trichosporon* das amostras analisadas neste estudo, através da região ITS (**Fig. 22**).



**Figura 22** – Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras, com iniciadores ITS1 e ITS2. Canaleta 1, T-01; canaleta 2, T-02; canaleta 3, T-03; canaleta 4, T-07; canaleta 5, T-08; canaleta 6, T-13; canaleta 7, T-14; canaleta 8, T-15; canaleta 9, T-17; canaleta 10, T-20; canaleta 11, T-21; canaleta 12, T-22; canaleta 13, T-23; canaleta 14, T-25; canaleta 15, T-26; canaleta 16, T-27; canaleta 17, T-28; canaleta 18, T-29; canaleta 19, T-30; e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).



**5.5.1.** Identificação genotípica do gênero *Trichosporon* das amostras analisadas neste estudo, através da região ITS (**Fig. 23**).



**Figura 23** - Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras, com iniciadores ITS1 e ITS2. Canaleta 1, T-31; canaleta 2, T-34; canaleta 3, T-35; canaleta 4, T-36; canaleta 5, T-37; canaleta 6, T-40; canaleta 7, T-41; canaleta 8, T-42; canaleta 9, T-44; canaleta 10, T-47; canaleta 11, T-48; canaleta 12, T-49; canaleta 13, T-52; canaleta 14, T-54; canaleta 15, T-55; canaleta 16, T-56; canaleta 17, T-57; canaleta 18, T-63; canaleta 19, T-65; canaleta 20, T-115; e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).

## 5.6. Identificação das espécies do gênero *Trichosporon* através de RAPD com o iniciador OPA2 a 35°C.

O iniciador OPA2, em análise visual dos géis de agarose do RAPD realizado com amostras padrão CBS produziu 6 fragmentos com 250 a 1.000 pares de base em *T. asahii*, 9 fragmentos com 300 a 1.400 pares de base em *T. asteróides*, 4 fragmentos com 100 a 1.000 pares de base em *T. coremiiforme*, 6 fragmentos com 100 a 1.400 pares de base em *T. inkin*. *Trichosporon mucoides* e *T. ovoides* produziram 11 fragmentos variando de 150 a 1.400 pares de base. As amostras caracterizadas como pertencentes ao gênero *Trichosporon* pela região ITS foram submetidas à análise genotípica das espécies pelo método do RAPD com o iniciador OPA2.

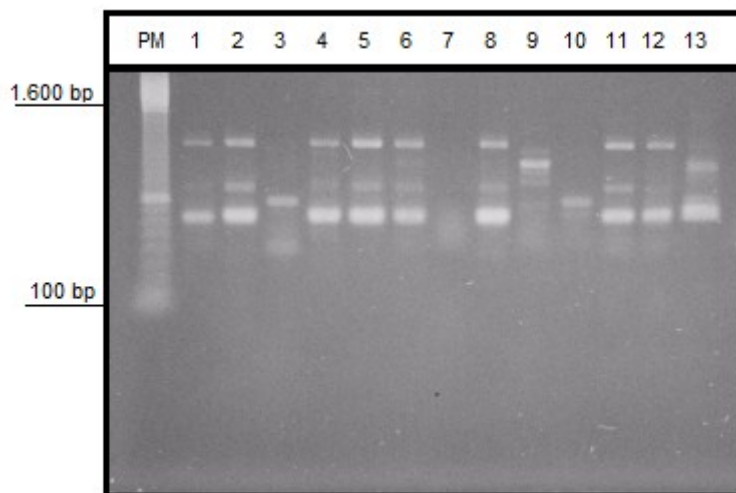
Como as amostras analisadas são de origens diferentes, os perfis foram também diversos. Foi considerado grau de similaridade com as amostras padrão CBS, com até 3 bandas de diferença em número ou tamanho de fragmentos (POWER, 1996). As amostras que apresentaram número e tamanho de bandas próximas das espécies padrão CBS foram classificadas como similares com a espécie afim e identificadas como tal.

Foram identificadas 26 amostras como *T. asahii*. Nove delas pelo perfil de bandas obtido no gel de agarose da fig. 24 (T-40, T-41, T-44, T-57, T-63, T-47, T-21 [nas canaletas 2 a 9, respectivamente], T-48 e T-55 [nas canaletas 11 e 12, respectivamente]). A figura 25 permite a identificação de mais duas amostras de *T. asahii* (T-03 e T-07; canaletas 4 e 7, respectivamente) através do perfil de bandas obtido no gel de agarose, assim como a figura 27 identifica as amostras T-31, T-37, T-56 e T-36 (canaletas 2, 3, 8 e 10, respectivamente). As amostras *T. asahii* de números T-14, T-15, T-17, T-20, T-22 (canaletas 2 a 6, respectivamente), T-27, T-29 e T-30 (canaletas 9 a 11, respectivamente) foram identificadas através do perfil de bandas do gel de agarose visualizados na figura 26. A figura 28 permite a identificação como *T. asahii*, das amostras T-34 e T-35 (canaletas 3 e 4, respectivamente), do mesmo modo a figura 29 identifica a amostra T-115.

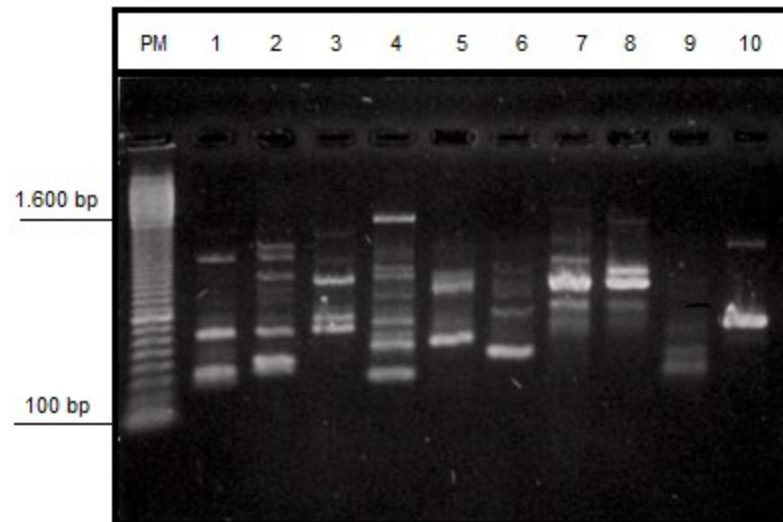
As cinco amostras identificadas pelos perfis obtidos nos géis de agarose como *Trichosporon asteroides* foram T-42 e T-02 (fig. 24, canaletas 10 e 13, respectivamente), e T-25 e T-26 (fig. 26, canaletas 7 e 8, respectivamente) e T-23 identificada na figura 28 (canaleta 2).

Como *T. ovoïdes* foram identificadas duas amostras, T-65 (fig. 28, canaleta 6) e T-08 (fig. 25, canaleta 8). *Trichosporon mucoides* foi identificado na amostra T-13, através do perfil de bandas obtido no gel de agarose da figura 29.

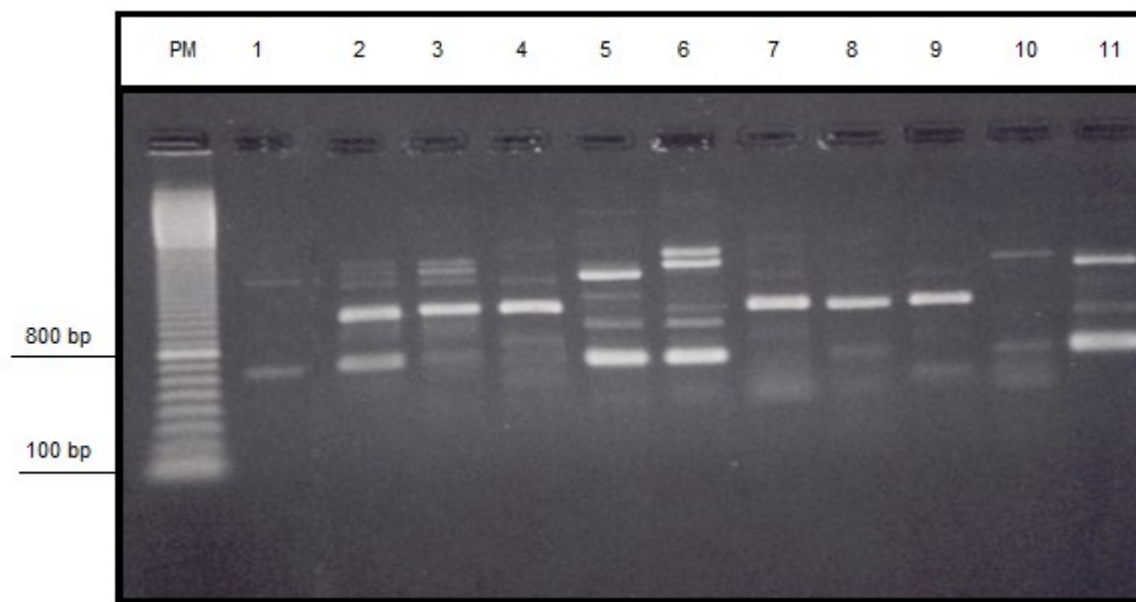
**5.6. Identificação genotípica das espécies do gênero *Trichosporon* através de RAPD com o iniciador OPA2 a 35°C.**



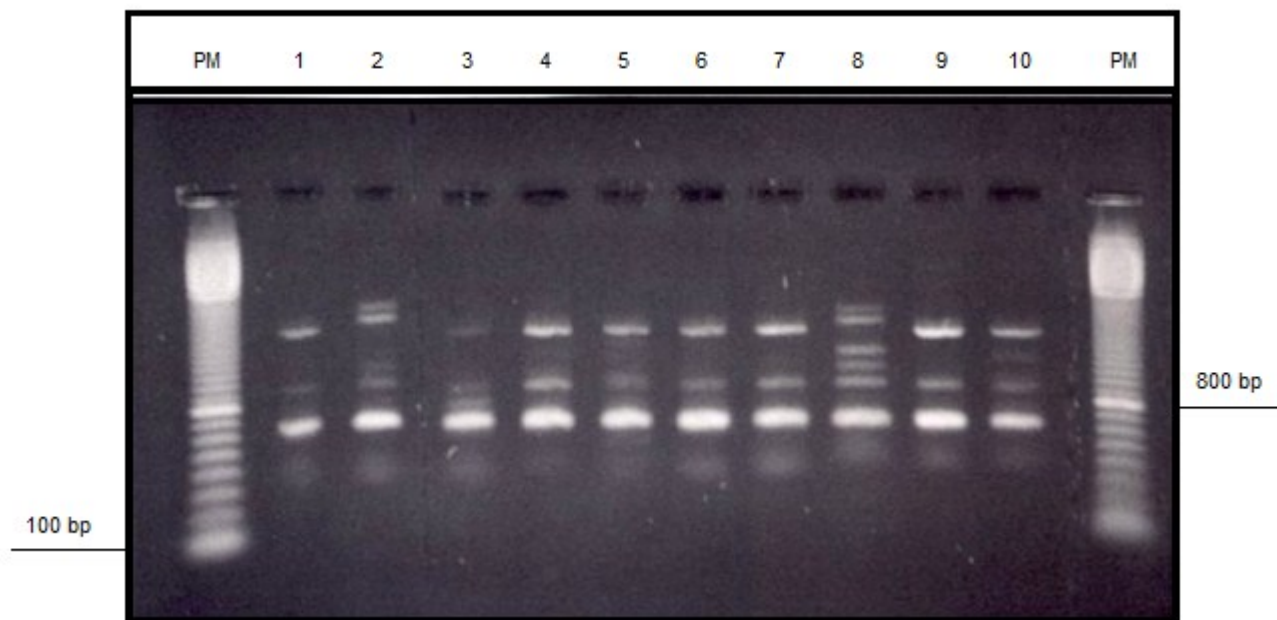
**Figura 24** – Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica de RAPD com iniciador OPA2. Canaleta 1, *T. asahii* (CBS 2479); canaleta 2, T-40; canaleta 3, T-41; canaleta 4, T-44; canaleta 5, T-57; canaleta 6, T-63; canaleta 7, T-115; canaleta 8, T-47; canaleta 9, T-21; canaleta 10, T-42; canaleta 11, T-48; canaleta 12, T-55; canaleta 13, T-02; PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).



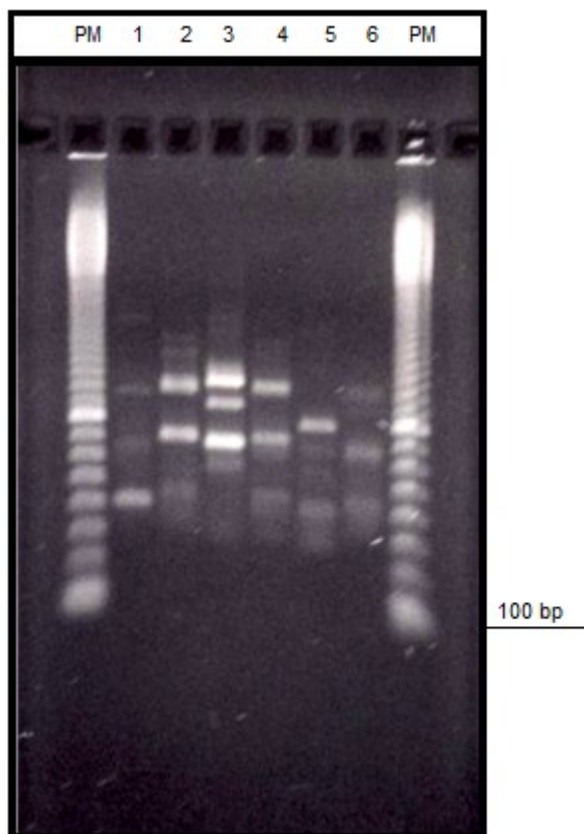
**Figura 25-** Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica de RAPD com iniciador OPA2. Canaleta 1, *T. asahii* (CBS 2479); canaleta 2, *T. asteroides* (CBS 3481); canaleta 3, T-02; canaleta 4, T-03; canaleta 5, *T. mucooides* (CBS 7625); canaleta 6, *T. ovoides* (CBS 7556); canaleta 7, T-07; canaleta 8, T-08; canaleta 9, *T. coremiiforme* (CBS 2482); canaleta 10, *T. inkin* (CBS 5585) e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).



**Figura 26-** Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica de RAPD com iniciador OPA2. Canaleta 1, *T. asahii* (CBS 2479); canaleta 2, T-14; canaleta 3, T-15; canaleta 4, T-17; canaleta 5, T-20; canaleta 6, T-22; canaleta 7, T-25; canaleta 8, T-26; canaleta 9, T-27; canaleta 10, T-29; canaleta 11, T-30; e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).

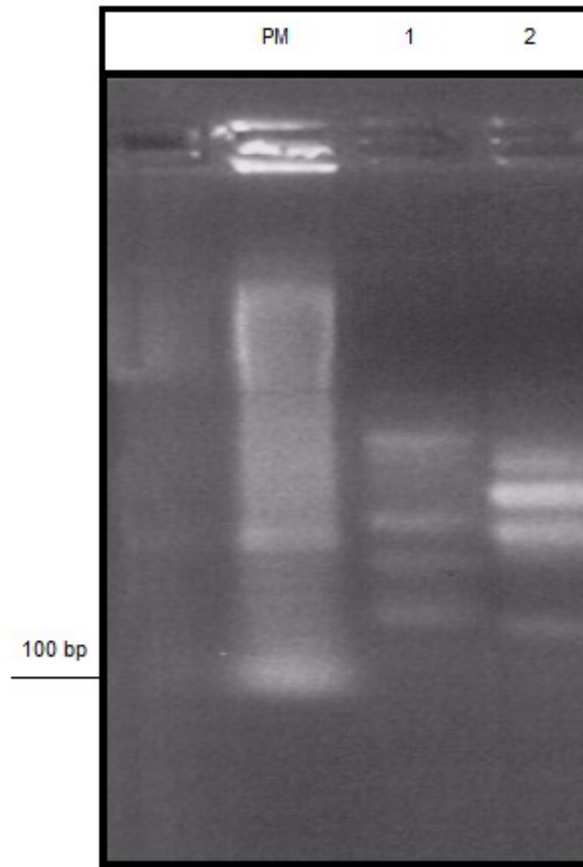


**Figura 27-** Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica de RAPD com iniciador OPA2. Canaleta 1, *T. asahii* (CBS 2479); canaleta 2, T-31; canaleta 3, T-37; canaleta 4, T-40; canaleta 5, T-44; canaleta 6, T-47; canaleta 7, T-48; canaleta 8, T-56; canaleta 9, T-57; canaleta 10, T-36; e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).



**Figura 28-** Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica de RAPD com iniciador OPA2. Canaleta 1, *T. asteroides* (CBS 3481); canaleta 2, T-23; canaleta 3, T-34; canaleta 4, T-35; canaleta 5, T-41; canaleta 6, T-65; e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).





**Figura 29-** Gel de agarose apresentando os perfis de amplificação das amostras pela técnica de RAPD com iniciador OPA2. Canaleta 1, T-115; canaleta 2, T-13; e PM, padrão de tamanho molecular (Pharmacia Biotech – 100 base-pair).

## 5.7. Perfil de susceptibilidade das amostras padrão CBS

As tabelas 5A, 5B, 5C e 5D permitem a comparação entre os dois métodos empregados em teste de susceptibilidade/resistência às quatro drogas antifúngicas (anfotericina B, 5 - flucitosina, fluconazol e itraconazol): NCCLS (método de microdiluição em caldo) e E-test, utilizados para avaliação do perfil de susceptibilidade das seis amostras CBS (CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES), e confrontar estes dados com os disponíveis na literatura para estas mesmas amostras.

No teste de susceptibilidade à anfotericina B (tabela 5A), apenas *T. inkin* apresentou resistência (64 µg/mL) através do NCCLS e E-test (32 µg/mL).

Quanto à 5 – flucitosina (tabela 5B), *T. asahii*, *T. inkin* e *T. coremiiforme* apresentaram perfil de sensibilidade enquanto *T. mucoïdes*, *T. asteroides* e *T. ovoides*, perfil de resistência.

*Trichosporon coremiiforme* mostrou-se sensível ao fluconazol (tabela 5C) através do NCCLS (1,0 µg/mL), mas resistente pelo E-test (>256 µg/mL) enquanto outras três amostras CBS (*T. asteroides*, *T. mucoïdes* e *T. ovoides*) apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade em ambos os métodos. *Trichosporon inkin* (>256 µg/mL pelo E-test e >64 µg/mL pelo NCCLS) e *T. asahii* (32 µg/mL em ambos os testes) apresentaram resistência pelos dois métodos.

Perfil de resistência ao itraconazol (tabela 5D) foi observado em todas as amostras neste experimento em ambos os métodos empregados.

No teste de susceptibilidade à anfotericina B (tabela 5A), apenas *T. inkin* apresentou resistência (64 µg/mL) através do NCCLS e E-test (32 µg/mL), as demais amostras CBS, embora variassem a CIM de acordo com o grupo de estudo, concordaram no resultado quanto à sensibilidade a este agente antifúngico.

Quanto à 5 – flucitosina (tabela 5B), *T. inkin* concordou quanto ao resultado de sensibilidade obtido por Gueho et al. (1994b) assim como *T. mucoïdes* e *T. ovoides* (resistente) embora divergissem quanto às CIMs. Apenas *Trichosporon asahii* apresentou sensibilidade pelo NCCLS e pelo E-test neste estudo havendo, portanto, divergência de Wolf et al. (2001) e Gueho et al. (1994b), que obtiveram perfil de resistência com a amostra. *Trichosporon coremiiforme* apresentou resistência à esta

droga mas não foi testado pelos dois autores, o mesmo se deu com *T. asteroides* (perfil de resistência neste estudo) que não apresentou crescimento no experimento realizado por Gueho et al. (1994b).

*Trichosporon coremiiforme* mostrou-se sensível ao fluconazol (tabela 5C) através do NCCLS (1,0 µg/mL), mas resistente pelo E-test (>256 µg/mL) enquanto outras três amostras CBS (*T. asteroides*, *T. mucoides* e *T. ovoides*) apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade em ambos os métodos, concordando com os resultados obtidos por Gueho et al. (1994b). *Trichosporon inkin* se mostrou resistente (>256 µg/mL pelo E-test e >64 µg/mL pelo NCCLS) pelos dois métodos, divergindo de Gueho et al. (1994). *Trichosporon asahii* convergiu apenas com o perfil de susceptibilidade obtido por Wolf et al. (2001), apresentando resistência pelos dois métodos testados.

Perfil de resistência ao itraconazol (tabela 5D) foi observado em todas as amostras neste experimento em ambos os métodos empregados. Estes resultados divergiram daqueles obtidos por Gueho et al. (1994b) mas concordaram com os de Wolf et al. (2001) quanto à *T. asahii* através do E-test.

A tabela 6 mostra a variação das CIMs para as amostras CBS do gênero *Trichosporon* frente à terbinafina, que varia de 0,03 µg/mL (*T. asahii*) a 8,0 µg/mL (*T. inkin*). *Trichosporon ovoides* e *T. coremiiforme* apresentaram CIM de 2,0 µg/mL.

O perfil de susceptibilidade frente ao voriconazol (tabela 7) com as amostras CBS revela uma variação das CIMs de 0,25 µg/mL (*T. mucoides* e *T. ovoides*) a 4,0 µg/mL (*T. inkin*). Segundo os valores recomendados pelo NCCLS M27 – A2, a sensibilidade ocorre em valores menores ou iguais à 1,0 µg/mL, portanto *T. inkin* apresentou resistência ao voriconazol.

**Tabela 5 A** – Susceptibilidade *in vitro* à anfotericina B de amostras de *Trichosporon* spp. da coleção CBS pelos métodos NCCLS e E-test (leitura de 48 horas).

| Espécies | CIM (µg/mL)                  |                    |                                  |                    |                                    |                   |                             |                 |                                |                   |                               |                   |
|----------|------------------------------|--------------------|----------------------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
|          | <i>T. asahii</i><br>CBS 2479 |                    | <i>T. asteroides</i><br>CBS 3481 |                    | <i>T. coremiiforme</i><br>CBS 2482 |                   | <i>T. inkin</i><br>CBS 5585 |                 | <i>T. mucoides</i><br>CBS 7625 |                   | <i>T. ovoides</i><br>CBS 7556 |                   |
|          | NCCLS                        |                    | E-test                           |                    | NCCLS                              |                   | E-test                      |                 | NCCLS                          |                   | E-test                        |                   |
|          | 0,25 <sup>1</sup>            | 0,25 <sup>1</sup>  | 1,0 <sup>1</sup>                 | 0,125 <sup>1</sup> | 0,5 <sup>1</sup>                   | 0,38 <sup>1</sup> | 64 <sup>1</sup>             | 32 <sup>1</sup> | 0,125 <sup>1</sup>             | 0,38 <sup>1</sup> | 0,125 <sup>1</sup>            | 0,25 <sup>1</sup> |
|          | 0,010 <sup>2</sup>           | -                  | 0,010 <sup>2</sup>               | -                  | -                                  | -                 | 0,010 <sup>2</sup>          | -               | 0,38 <sup>2</sup>              | -                 | 0,078 <sup>2</sup>            | -                 |
|          | 0,25 <sup>3</sup>            | 0,125 <sup>3</sup> | -                                | -                  | -                                  | -                 | -                           | -               | -                              | -                 | -                             | -                 |

= Teste não realizado

<sup>1</sup>Resultado dos testes realizados neste experimento com amostras CBS através do NCCLS e E-test.

<sup>2</sup>GUÉHO et al. (1994) = Teste realizado pelo método de microdiluição em placa, recomendado pelo NCCLS; leitura das CIMs feita por sistema automatizado.

<sup>3</sup>WOLF et al. (2001) = Teste realizado pelo método de microdiluição em placa, recomendado pelo NCCLS; leitura das CIMs feita por sistema visual.

CBS = CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES

**Tabela 5 B** - Susceptibilidade *in vitro* à 5-flucitosina de amostras de *Trichosporon* spp. da coleção CBS pelos métodos NCCLS e E-test (leitura de 48 horas).

| Espécies | CIM (µg/mL)                  |                  |                                  |                  |                                    |                   |                             |                    |                                |                  |                               |                  |
|----------|------------------------------|------------------|----------------------------------|------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
|          | <i>T. asahii</i><br>CBS 2479 |                  | <i>T. asteroides</i><br>CBS 3481 |                  | <i>T. coremiiforme</i><br>CBS 2482 |                   | <i>T. inkin</i><br>CBS 5585 |                    | <i>T. mucoides</i><br>CBS 7625 |                  | <i>T. ovoides</i><br>CBS 7556 |                  |
|          | NCCLS                        | E-test           | NCCLS                            | E-test           | NCCLS                              | E-test            | NCCLS                       | E-test             | NCCLS                          | E-test           | NCCLS                         | E-test           |
|          | 2,0 <sup>1</sup>             | 8,0 <sup>1</sup> | 32 <sup>1</sup>                  | >32 <sup>1</sup> | 0,5 <sup>1</sup>                   | 0,75 <sup>1</sup> | 2,0 <sup>1</sup>            | 0,006 <sup>1</sup> | 64 <sup>1</sup>                | >32 <sup>1</sup> | 32 <sup>1</sup>               | >32 <sup>1</sup> |
|          | >50 <sup>2</sup>             | -                | S/C <sup>2</sup>                 | -                | -                                  | -                 | 12,5 <sup>2</sup>           | -                  | 50 <sup>2</sup>                | -                | 50 <sup>2</sup>               | -                |
|          | 128 <sup>3</sup>             | >32 <sup>3</sup> | -                                | -                | -                                  | -                 | -                           | -                  | -                              | -                | -                             | -                |

S/C = Sem crescimento

<sup>1</sup>Resultado dos testes realizados neste experimento com amostras CBS através do NCCLS e E-test.

<sup>2</sup>GUÉHO et al. (1994) = Teste realizado pelo método de microdiluição em placa, recomendado pelo NCCLS; leitura das CIMs feita por sistema automatizado.

<sup>3</sup>WOLF et al. (2001) = Teste realizado pelo método de microdiluição em placa, recomendado pelo NCCLS; leitura das CIMs feita por sistema visual.

CBS = CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES

**Tabela 5 C** - Susceptibilidade *in vitro* ao Fluconazol de amostras de *Trichosporon* spp. da coleção CBS pelos métodos NCCLS e E-test (leitura de 48 horas).

| Espécies | CIM (µg/mL)                  |                 |                                  |                   |                                    |                   |                             |                   |                                |                  |                               |                   |
|----------|------------------------------|-----------------|----------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------|
|          | <i>T. asahii</i><br>CBS 2479 |                 | <i>T. asteroides</i><br>CBS 3481 |                   | <i>T. coremiiforme</i><br>CBS 2482 |                   | <i>T. inkin</i><br>CBS 5585 |                   | <i>T. mucoides</i><br>CBS 7625 |                  | <i>T. ovoides</i><br>CBS 7556 |                   |
|          | NCCLS                        | E-test          | NCCLS                            | E-test            | NCCLS                              | E-test            | NCCLS                       | E-test            | NCCLS                          | E-test           | NCCLS                         | E-test            |
|          | 32 <sup>1</sup>              | 32 <sup>1</sup> | 0,5 <sup>1</sup>                 | 0,75 <sup>1</sup> | 1,0 <sup>1</sup>                   | >256 <sup>1</sup> | >64 <sup>1</sup>            | >256 <sup>1</sup> | 0,5 <sup>1</sup>               | 8,0 <sup>1</sup> | 2,0 <sup>1</sup>              | 0,38 <sup>1</sup> |
|          | 0,015 <sup>2</sup>           | -               | 0,38 <sup>2</sup>                | -                 | -                                  | -                 | 1,56 <sup>2</sup>           | -                 | 6,25 <sup>2</sup>              | -                | 6,25 <sup>2</sup>             | -                 |
|          | 16 <sup>3</sup>              | 32 <sup>3</sup> | -                                | -                 | -                                  | -                 | -                           | -                 | -                              | -                | -                             | -                 |

<sup>1</sup>Resultado dos testes realizados neste experimento com amostras CBS através do NCCLS e E-test.

<sup>2</sup>GUÉHO et al. (1994) = Teste realizado pelo método de microdiluição em placa, recomendado pelo NCCLS; leitura das CIMs feita por sistema automatizado.

<sup>3</sup>WOLF et al. (2001) = Teste realizado pelo método de microdiluição em placa, recomendado pelo NCCLS; leitura das CIMs feita por sistema visual.

CBS = CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES

**Tabela 5 D** - Susceptibilidade *in vitro* ao Itraconazol de amostras de *Trichosporon* spp. da coleção CBS pelos métodos NCCLS e E-test (leitura de 48 horas).

| Espécies | CIM (µg/mL)                  |                  |                                  |                   |                                    |                   |                             |                  |                                |                   |                               |                   |
|----------|------------------------------|------------------|----------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
|          | <i>T. asahii</i><br>CBS 2479 |                  | <i>T. asteroides</i><br>CBS 3481 |                   | <i>T. coremiiforme</i><br>CBS 2482 |                   | <i>T. inkin</i><br>CBS 5585 |                  | <i>T. mucoides</i><br>CBS 7625 |                   | <i>T. ovoides</i><br>CBS 7556 |                   |
|          | NCCLS                        | E-test           | NCCLS                            | E-test            | NCCLS                              | E-test            | NCCLS                       | E-test           | NCCLS                          | E-test            | NCCLS                         | E-test            |
|          | 2,0 <sup>1</sup>             | 1,0 <sup>1</sup> | 0,5                              | 0,75 <sup>1</sup> | 2,0 <sup>1</sup>                   | 0,75 <sup>1</sup> | >64 <sup>1</sup>            | >32 <sup>1</sup> | 2,0 <sup>1</sup>               | 0,75 <sup>1</sup> | 2,0 <sup>1</sup>              | 0,38 <sup>1</sup> |
|          | 0,019 <sup>2</sup>           | -                | 0,010 <sup>2</sup>               | -                 | -                                  | -                 | 0,019 <sup>2</sup>          | -                | 0,019 <sup>2</sup>             | -                 | 0, <sup>0192</sup>            | -                 |
|          | ND <sup>3</sup>              | 1,0 <sup>3</sup> | -                                | -                 | -                                  | -                 | -                           | -                | -                              | -                 | -                             | -                 |

ND = Não Detectado

<sup>1</sup>Resultado dos testes realizados neste experimento com amostras CBS através do NCCLS e E-test.

<sup>2</sup>GUÉHO et al. (1994) = Teste realizado pelo método de microdiluição em placa, recomendado pelo NCCLS; leitura das CIMs feita por sistema automatizado.

<sup>3</sup>WOLF et al. (2001) = Teste realizado pelo método de microdiluição em placa, recomendado pelo NCCLS; leitura das CIMs feita por sistema visual.

CBS = CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES

**Tabela 6** - Susceptibilidade *in vitro* à terbinafina de amostras de *Trichosporon* spp. da coleção CBS pelo método NCCLS (leitura de 48 horas).

| CIM (µg/mL) |                             |                      |                        |                  |                    |                   |
|-------------|-----------------------------|----------------------|------------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| Espécies    | <i>T. asahii</i>            | <i>T. asteroides</i> | <i>T. coremiiforme</i> | <i>T. inkin</i>  | <i>T. mucoides</i> | <i>T. ovoides</i> |
|             | CBS 2479                    | CBS 3481             | CBS 2482               | CBS 5585         | CBS 7625           | CBS 7556          |
|             | NCCLS                       | NCCLS                | NCCLS                  | NCCLS            | NCCLS              | NCCLS             |
|             | 0,03 <sup>1</sup>           | 1,0 <sup>1</sup>     | 2,0 <sup>1</sup>       | 8,0 <sup>1</sup> | 0,250 <sup>1</sup> | 2,0 <sup>1</sup>  |
|             | <i>Candida albicans</i>     |                      |                        |                  |                    |                   |
|             | CIM 1,4 µg/mL <sup>2*</sup> |                      |                        |                  |                    |                   |

\*Média geométrica obtida em estudo realizado com vários fungos patogênicos (Não há dados disponíveis na literatura especificamente com leveduras do gênero *Trichosporon*)

<sup>1</sup>Resultado dos testes realizados neste experimento com amostras CBS através do NCCLS e E-test.

<sup>2</sup>Ryder (1999)



**Tabela 7** - Susceptibilidade *in vitro* ao voriconazol\* de amostras de *Trichosporon* spp. da coleção CBS pelo método NCCLS (leitura de 48 horas).

| CIM (µg/mL) |                            |                      |                        |                          |                    |                   |
|-------------|----------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|
| Espécies    | <i>T. asahii</i>           | <i>T. asteroides</i> | <i>T. coremiiforme</i> | <i>T. inkin</i>          | <i>T. mucoides</i> | <i>T. ovoides</i> |
|             | CBS 2479                   | CBS 3481             | CBS 2482               | CBS 5585                 | CBS 7625           | CBS 7556          |
|             | NCCLS                      | NCCLS                | NCCLS                  | NCCLS                    | NCCLS              | NCCLS             |
|             | 0,5 <sup>1</sup>           | 0,5 <sup>1</sup>     | 1,0 <sup>1</sup>       | 4,0 <sup>1</sup>         | 0,250 <sup>1</sup> | 0,25 <sup>1</sup> |
|             | <i>Trichosporon</i> spp.   |                      |                        |                          |                    |                   |
|             | Variação da CIM 24 horas   |                      |                        | Variação da CIM 48 horas |                    |                   |
|             | ≤0,015 – 0,06 <sup>2</sup> |                      |                        | 0,03 – 0,06 <sup>2</sup> |                    |                   |
|             | Fungos em geral            |                      |                        |                          |                    |                   |
|             | Variação da CIM            |                      |                        | Inibição das amostras    |                    |                   |
|             | 0,03 – 16 <sup>3</sup>     |                      |                        | ≤ 1,0 <sup>3</sup>       |                    |                   |

\*Não há dados disponíveis na literatura com referência às espécies do gênero *Trichosporon*.

<sup>1</sup>Resultado dos testes realizados neste experimento com amostras CBS através do NCCLS e E-test.

<sup>2</sup>Uzun et al. (2000)

<sup>3</sup>NCCLS M27-A2

## 5.8. Perfil de susceptibilidade das amostras analisadas segundo o gênero

A tabela 8 apresenta as CIMs obtidas e revela o perfil de elevada resistência do gênero *Trichosporon* à anfotericina B (CIM<sub>90</sub> 64µg/mL em 24 e 48 horas) e ao itraconazol (CIM<sub>90</sub> 8µg/mL/24 horas e 16µg/mL/48 horas) de alta sensibilidade ao fluconazol (CIM<sub>90</sub> 8µg/mL em 24 e 48 horas) e baixa resistência à 5-flucitosina (apenas CIM<sub>90</sub>/48 horas com 32 µg/mL). A tabela 8 apresenta as CIMs obtidas e revela o perfil de elevada resistência do gênero *Trichosporon* à anfotericina B e ao itraconazol, de alta sensibilidade ao fluconazol e baixa resistência à 5-flucitosina (apenas CIM<sub>90</sub>/48 horas com 32 µg/mL). Uzun et al. (2000) analisando a susceptibilidade *in vitro* de oito amostras de *Trichosporon* encontraram sensibilidade à anfotericina (CIM<sub>50</sub> 24/48 horas de 0,5/1,0 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 24/48 de 1,0/1,0 µg/mL) divergindo dos resultados deste estudo mas concordando quanto ao fluconazol onde estes autores obtiveram sensibilidade com CIM<sub>50</sub> 24/48 horas de 2,0/4,0 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 24/48 horas de 4,0/4,0 µg/mL e, com relação ao itraconazol, SDD com CIM<sub>50</sub> 24/48 horas 0,5/0,5 µg/mL e resistência com CIM<sub>90</sub> 24/48 horas 1,0 µg/mL.

## 5.9. Perfil de susceptibilidade das amostras analisadas segundo as espécies de *Trichosporon*

Resistência ao itraconazol foi observada em todas as espécies (tabela 9D) assim como sensibilidade ao fluconazol (tabela 9C). Apenas *T. mucoides* foi sensível a anfotericina B (tabela 9A), à terbinafina (tabela 9E) e ao voriconazol (tabela 9F), sendo as demais espécies resistentes à essas drogas. Sensibilidade a 5-flucitosina (tabela 9B) foi observada apenas em *T. asahii* e *T. ovoides*. *Trichosporon asahii* e *T. asteroides* apresentaram CIM  $\geq 1,4$  µg/mL (CIM<sub>90</sub>/48 horas de 8,0µg/mL para as duas espécies) frente à terbinafina (tabela 9E).

A tabela 10A mostra que *T. asahii* apresentou as maiores variações de CIM para anfotericina B e 5-flucitosina e *T. mucoides* as menores. *Trichosporon asahii* também apresentou as maiores variações da CIM para fluconazol e itraconazol (tabela 10B), nas

quais as menores variações foram de *T. mucoides* e *T. ovoides*, respectivamente. E para voriconazol e terbinafina (tabela 10C), as maiores variações da CIM foram obtidas por *T. asahii* e as menores por *T. mucoides*.

A distribuição do perfil de susceptibilidade/resistência *in vitro* das leveduras do gênero *Trichosporon* frente à anfotericina B (tabela 11A) mostra que 19 dentre as 26 amostras de *T. asahii* apresentaram resistência; apenas duas amostras de *T. asteroides* apresentaram resistência para 5-flucitosina (tabela 11B) e duas amostras de *T. asahii* para fluconazol (tabela 11C) e todas as espécies para itraconazol (tabela 11D). Quinze amostras (*T. ovoides*, *T. mucoides*, *T. asteroides* e *T. asahii*) apresentaram CIM entre 1 e 2 µg/mL para terbinafina (tabela 11E) e seis amostras de *T. asahii* com CIM de 8 µg/mL. Dezoito amostras (*T. ovoides*, *T. asteroides* e *T. asahii*) apresentaram CIM entre 1 e 2 µg/mL para voriconazol (tabela 11F) e duas amostras de *T. asahii* com CIM de 4 µg/mL.

De acordo com a tabela 12A, 76% dos isolados são *T. asahii*, seguido de *T. asteroides* (15%), *T. ovoides* (6%), e por fim *T. mucoides* (3%). Setenta por cento das amostras foram resistentes à anfotericina B, dentre elas *T. asahii* com 73%, *T. asteroides* com 80% e *T. ovoides* com 50%. Oitenta e cinco por cento foram sensíveis à 5-flucitosina, distribuídas entre *T. asahii* (92%), *T. asteroides* (60%) e *T. ovoides* (100%). Noventa e quatro por cento das amostras testadas foram sensíveis ao fluconazol enquanto 100% de resistência foi observado com relação ao itraconazol. A sensibilidade ao voriconazol foi observada em 85% de *T. asahii*, 60% de *T. asteroides*, 100% de *T. mucoides* e 50% de *T. ovoides* (tabela 12B). As amostras que apresentaram leitura dúbia (fig. 30; amostra F, poço 8) foram submetidas a macrodiluição em caldo.

**Tabela 8** – Susceptibilidade *in vitro* das amostras de leveduras do gênero *Trichosporon* frente aos seis antifúngicos testados pelo NCCLS (2002).

| Antifúngicos   | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) total         |  |  |  |
|----------------|--|--|--|--|
|                | 24 horas                               |  | 48 horas                               |  |
|                | CIM <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) | CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) | CIM <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) | CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
| Anfotericina B | 2,0                                    | 64,0                                   | 4,0                                    | 64,0                                   |
| 5-Flucitosina  | 2,0                                    | 8,0                                    | 4,0                                    | 32,0                                   |
| Fluconazol     | 2,0                                    | 8,0                                    | 2,0                                    | 8,0                                    |
| Itraconazol    | 2,0                                    | 8,0                                    | 4,0                                    | 16,0                                   |
| Terbinafina    | 0,5                                    | 4,0                                    | 2,0                                    | 8,0                                    |
| Voriconazol    | 0,5                                    | 1,0                                    | 1,0                                    | 2,0                                    |

CIM<sub>50</sub> = valor de CIM da droga capaz de inibir 50% das amostras

CIM<sub>90</sub> = valor de CIM da droga capaz de inibir 90% das amostras

**Tabela 9A** – Susceptibilidade *in vitro* de espécies do gênero *Trichosporon* frente à anfotericina B.

| Espécies<br>(n total = 34) | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )               |  |  |  |
|----------------------------|--|--|--|--|
|                            | 24 horas                               |  | 48 horas                               |  |
|                            | CIM <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) | CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) | CIM <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) | CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
| <i>T. asahii</i> (26)      | 2,0                                    | 64,0                                   | 4,0                                    | 64,0                                   |
| <i>T. asteroides</i> (05)  | 0,5                                    | 2,0                                    | 2,0                                    | 64,0                                   |
| <i>T. mucoides</i> (01)    | 1,0                                    | 1,0                                    | 1,0                                    | 1,0                                    |
| <i>T. ovoides</i> (02)     | 0,125                                  | 0,5                                    | 0,125                                  | 2,0                                    |

CIM<sub>50</sub> = valor de CIM da droga capaz de inibir 50% das amostras

CIM<sub>90</sub> = valor de CIM da droga capaz de inibir 90% das amostras

**Tabela 9B** - Susceptibilidade *in vitro* de espécies do gênero *Trichosporon* frente à 5-flucitosina.

| Espécie<br>(n total = 34) | CIM (µg/mL)               |                           |                           |                           |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                           | 24 horas                  |                           | 48 horas                  |                           |
|                           | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) |
| <i>T. asahii</i> (26)     | 2,0                       | 8,0                       | 4,0                       | 16,0                      |
| <i>T. asteroides</i> (05) | 2,0                       | 64,0                      | 8,0                       | >64,0                     |
| <i>T. mucoides</i> (01)   | >64,0                     | >64,0                     | >64,0                     | >64,0                     |
| <i>T. ovoides</i> (02)    | 1,0                       | 8,0                       | 2,0                       | 8,0                       |

**Tabela 9C** – Susceptibilidade *in vitro* de espécies do gênero *Trichosporon* frente ao fluconazol.

| Espécies<br>(n total = 34) | CIM (µg/mL)               |                           |                           |                           |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                            | 24 horas                  |                           | 48 horas                  |                           |
|                            | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) |
| <i>T. asahii</i> (26)      | 2,0                       | 8,0                       | 4,0                       | 8,0                       |
| <i>T. asteroides</i> (05)  | 1,0                       | 2,0                       | 2,0                       | 8,0                       |
| <i>T. mucoides</i> (01)    | 0,5                       | 0,5                       | 2,0                       | 2,0                       |
| <i>T. ovoides</i> (02)     | 0,5                       | 4,0                       | 0,5                       | 8,0                       |

**Tabela 9D** - Susceptibilidade *in vitro* de espécies do gênero *Trichosporon* frente ao itraconazol.

| Espécies<br>(n total = 34) | CIM (µg/mL)               |                           |                           |                           |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                            | 24 horas                  |                           | 48 horas                  |                           |
|                            | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) |
| <i>T. asahii</i> (26)      | 2,0                       | 8,0                       | 4,0                       | 16,0                      |
| <i>T. asteroides</i> (05)  | 2,0                       | 4,0                       | 8,0                       | 16,0                      |
| <i>T. mucoides</i> (01)    | 0,5                       | 0,5                       | 4,0                       | 4,0                       |
| <i>T. ovoides</i> (02)     | 0,5                       | 2,0                       | 2,0                       | 2,0                       |

**Tabela 9E** - Susceptibilidade *in vitro* de espécies do gênero *Trichosporon* frente à terbinafina.

| Espécies<br>(n total = 34) | CIM (µg/mL)               |                           |                           |                           |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                            | 24 horas                  |                           | 48 horas                  |                           |
|                            | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) |
| <i>T. asahii</i> (26)      | 0,5                       | 4,0                       | 2,0                       | 8,0                       |
| <i>T. asteroides</i> (05)  | 1,0                       | 4,0                       | 4,0                       | 8,0                       |
| <i>T. mucoides</i> (01)    | 0,5                       | 0,5                       | 1,0                       | 1,0                       |
| <i>T. ovoides</i> (02)     | 0,03                      | 1,0                       | 0,25                      | 2,0                       |

**Tabela 9F** - Susceptibilidade *in vitro* de espécies do gênero *Trichosporon* frente ao voriconazol.

| Espécies<br>(n total = 34) | CIM (µg/mL)               |                           |                           |                           |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                            | 24 horas                  |                           | 48 horas                  |                           |
|                            | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) |
| <i>T. asahii</i> (26)      | 0,5                       | 1,0                       | 1,0                       | 2,0                       |
| <i>T. asteroides</i> (05)  | 0,5                       | 1,0                       | 1,0                       | 2,0                       |
| <i>T. mucooides</i> (01)   | 0,25                      | 0,25                      | 0,5                       | 0,5                       |
| <i>T. ovoides</i> (02)     | 0,03                      | 2,0                       | 0,5                       | 2,0                       |

**Tabela 10A** - Distribuição dos valores de variação das CIMs de anfotericina B e 5-flucitosina de espécies do gênero *Trichosporon*.

| Espécies<br>(n total = 34) | Variação das CIMs (µg/mL) |              |               |               |
|----------------------------|---------------------------|--------------|---------------|---------------|
|                            | Anfotericina B            |              | 5-Flucitosina |               |
|                            | 24 horas                  | 48 horas     | 24 horas      | 48 horas      |
| <i>T. asahii</i> (26)      | 0,062 – 64,0              | 0,062 – 64,0 | 0,25 – 32,0   | 0,25 - >64,0  |
| <i>T. asteroides</i> (05)  | 0,5 – 2,0                 | 1,0 – 4,0    | 0,25 – 64,0   | 4,0 - >64,0   |
| <i>T. mucooides</i> (01)   | 1,0 – 1,0                 | 1,0 – 1,0    | >64,0 - >64,0 | >64,0 - >64,0 |
| <i>T. ovoides</i> (02)     | 0,125 – 0,5               | 0,125 – 2,0  | 1,0 – 8,0     | 2,0 – 8,0     |

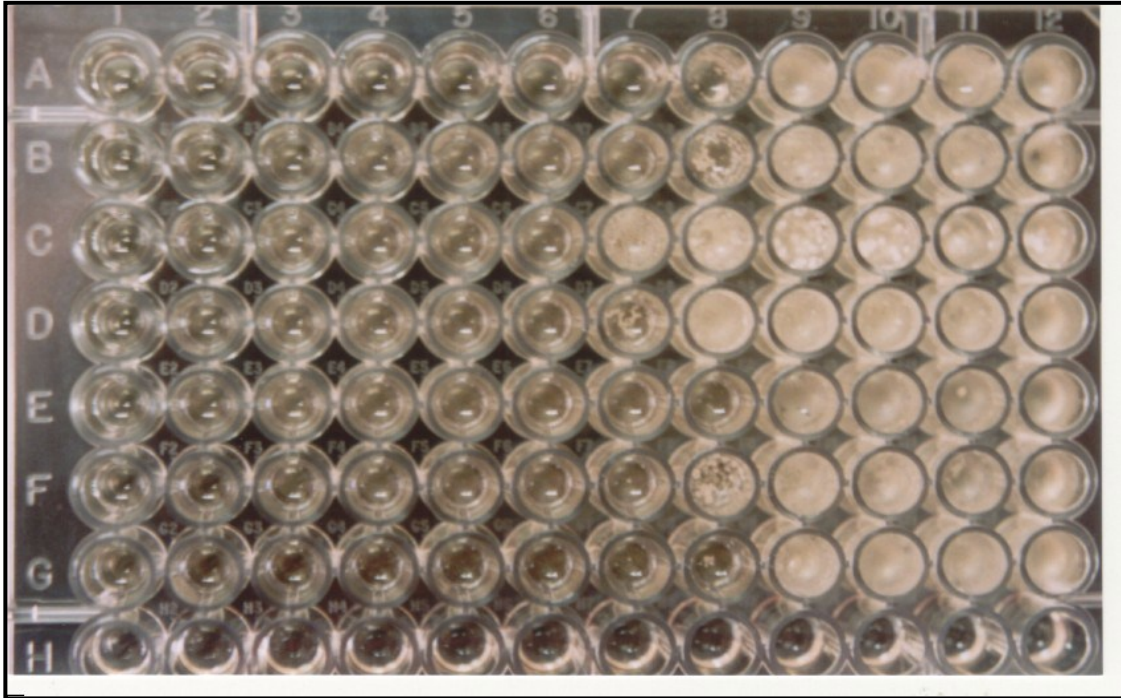
**Tabela 10B** - Distribuição dos valores de variação das CIMs de fluconazol e itraconazol de leveduras do gênero *Trichosporon*.

| Espécies<br>+(n total = 34) | Variação das CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) |            |             |            |
|-----------------------------|--|------------|-------------|------------|
|                             | Fluconazol                             |            | Itraconazol |            |
|                             | 24 horas                               | 48 horas   | 24 horas    | 48 horas   |
| <i>T. asahii</i> (26)       | 0,5 – 8,0                              | 0,5 – 16,0 | 0,5 – 32,0  | 0,5 – 64,0 |
| <i>T. asteroides</i> (05)   | 0,5 – 2,0                              | 1,0 – 8,0  | 2,0 – 4,0   | 2,0 – 16,0 |
| <i>T. mucoides</i> (01)     | 0,5 – 0,5                              | 2,0 – 2,0  | 0,5 – 0,5   | 4,0 – 4,0  |
| <i>T. ovoides</i> (02)      | 0,5 – 4,0                              | 0,5 – 8,0  | 0,5 – 2,0   | 2,0 – 2,0  |

**Tabela 10C** - Distribuição dos valores de variação das CIMs de terbinafina e voriconazol de leveduras do gênero *Trichosporon*.

| Espécies<br>(n total = 34) | Variação das CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) |             |             |             |
|----------------------------|--|-------------|-------------|-------------|
|                            | Terbinafina                            |             | Voriconazol |             |
|                            | 24 horas                               | 48 horas    | 24 horas    | 48 horas    |
| <i>T. asahii</i> (26)      | 0,031 – 4,0                            | 0,031 – 8,0 | 0,031 – 1,0 | 0,031 – 4,0 |
| <i>T. asteroides</i> (05)  | 0,25 - 4,0                             | 2,0 – 8,0   | 0,062 – 1,0 | 0,5 – 2,0   |
| <i>T. mucoides</i> (01)    | 0,5 – 0,5                              | 1,0 – 1,0   | 0,25 – 0,25 | 0,5 – 0,5   |
| <i>T. ovoides</i> (02)     | 0,031 – 1,0                            | 0,25 – 2,0  | 0,03 – 2,0  | 0,5 – 2,0   |





**Fig. 30** – Microdiluição em caldo pelo método NCCLS. Leitura dúbia no poço 7 da amostra D.

**Tabela 11A** - Susceptibilidade/resistência *in vitro* de leveduras do gênero *Trichosporon*, à anfotericina B, determinado pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas).

| Espécies (n = 34)    |          | Número de isolados inibidos por <u>anfotericina B</u> nas concentrações (µg/mL) |      |       |      |     |   |   |   |   |    |    |    |
|----------------------|----------|---|------|-------|------|-----|---|---|---|---|----|----|----|
|                      |          | 0,03  | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 |
| <i>T. asahii</i>     | (n = 26) | -   | 1    | 1     | -    | 1   | 4 | 3 | 4 | - | 3  | -  | 9  |
| <i>T. asteroides</i> | (n = 05) | -   | -    | -     | -    | -   | 1 | 2 | 1 | - | -  | -  | 1  |
| <i>T. mucoides</i>   | (n = 01) | -   | -    | -     | -    | -   | 1 | - | - | - | -  | -  | -  |
| <i>T. ovoides</i>    | (n = 02) | -   | -    | 1     | -    | -   | - | 1 | - | - | -  | -  | -  |
| Total                | (n = 34) | -   | 1    | 2     | -    | 1   | 6 | 6 | 5 | - | 3  | -  | 10 |

**Tabela 11B** - Susceptibilidade /resistência *in vitro* de leveduras do gênero *Trichosporon*, à 5-flucitosina, determinado pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas).

| Espécies (n = 34)    |          | Número de isolados inibidos por <u>5-flucitosina</u> nas concentrações (µg/mL) |      |     |   |   |    |   |    |    |    |     |     |
|----------------------|----------|--|------|-----|---|---|----|---|----|----|----|-----|-----|
|                      |          | 0,125  | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4  | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| <i>T. asahii</i>     | (n = 26) | -  | 2    | 3   | 2 | 3 | 5  | 3 | 6  | 1  | -  | 1   | -   |
| <i>T. asteroides</i> | (n = 05) | -  | -    | -   | - | - | 2  | 1 | -  | 1  | -  | -   | 1   |
| <i>T. mucoides</i>   | (n = 01) | -  | -    | -   | - | - | -- | - | -  | -  | -  | -   | 1   |
| <i>T. ovoides</i>    | (n = 02) | -  | -    | -   | - | 1 | -  | 1 | -  | -  | -  | -   | -   |
| Total                | (n = 34) | -  | 2    | 3   | 2 | 4 | 7  | 5 | 6  | 2  | -  | 1   | 2   |

**Tabela 11C** - Susceptibilidade /resistência *in vitro* de leveduras do gênero *Trichosporon*, ao fluconazol, determinado pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas).

| Espécies (n = 34)    |          | Número de isolados inibidos por <u>fluconazol</u> nas concentrações (µg/mL) |      |       |      |     |   |   |   |   |    |    |    |
|----------------------|----------|---|------|-------|------|-----|---|---|---|---|----|----|----|
|                      |          | 0,03  | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 |
| <i>T. asahii</i>     | (n = 26) | -   | -    | -     | -    | 3   | 4 | 4 | 6 | 7 | 2  | -  | -  |
| <i>T. asteroides</i> | (n = 05) | -   | -    | -     | -    | -   | 2 | 2 | - | 1 | -  | -  | -  |
| <i>T. mucoides</i>   | (n = 01) | -   | -    | -     | -    | -   | - | 1 | - | - | -  | -  | -  |
| <i>T. ovoides</i>    | (n = 02) | -   | -    | -     | -    | 1   | - | - | - | 1 | -  | -  | -  |
| Total                | (n = 34) | -   | -    | -     | -    | 4   | 6 | 7 | 6 | 9 | 2  | -  | -  |

**Tabela 11D** - Susceptibilidade /resistência *in vitro* de leveduras do gênero *Trichosporon*, ao itraconazol, determinado pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas).

| Espécies (n = 34)    |          | Número de isolados inibidos por <u>itraconazol</u> nas concentrações (µg/mL) |      |       |      |     |   |    |   |    |    |    |    |
|----------------------|----------|--|------|-------|------|-----|---|----|---|----|----|----|----|
|                      |          | 0,03   | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2  | 4 | 8  | 16 | 32 | 64 |
| <i>T. asahii</i>     | (n = 26) | -  | -    | -     | -    | 2   | 2 | 7  | 2 | 9  | 2  | -  | 2  |
| <i>T. asteroides</i> | (n = 05) | -  | -    | -     | -    | -   | - | 1  | - | 3  | 1  | -  | -  |
| <i>T. mucoides</i>   | (n = 01) | -  | -    | -     | -    | -   | - | -  | 1 | -  | -  | -  | -  |
| <i>T. ovoides</i>    | (n = 02) | -  | -    | -     | -    | -   | - | 2  | - | -  | -  | -  | -  |
| Total                | (n = 34) | -  | -    | -     | -    | 2   | 2 | 10 | 3 | 12 | 3  | -  | 2  |

**Tabela 11E** - Susceptibilidade /resistência *in vitro* de leveduras do gênero *Trichosporon*, à terbinafina, determinado pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas).

| Espécies (n = 34)    |          | Número de isolados inibidos por <u>terbinafina</u> nas concentrações (µg/mL) |      |       |      |     |   |    |   |   |    |    |    |
|----------------------|----------|--|------|-------|------|-----|---|----|---|---|----|----|----|
|                      |          | 0,03   | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2  | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 |
| <i>T. asahii</i>     | (n = 26) | 3  | -    | -     | 1    | 3   | 2 | 9  | 2 | 6 | -  | -  | -  |
| <i>T. asteroides</i> | (n = 05) | -  | -    | -     | -    | -   | - | 2  | 2 | 1 | -  | -  | -  |
| <i>T. mucoides</i>   | (n = 01) | -  | -    | -     | -    | -   | 1 | -  | - | - | -  | -  | -  |
| <i>T. ovoides</i>    | (n = 02) | -  | -    | -     | 1    | -   | - | 1  | - | - | -  | -  | -  |
| Total                | (n = 34) | 3  | -    | -     | 2    | 3   | 3 | 12 | 4 | 7 | -  | -  | -  |

**Tabela 11F** - Susceptibilidade /resistência *in vitro* de leveduras do gênero *Trichosporon*, ao voriconazol, determinado pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo NCCLS (leitura de 48 horas).

| Espécies (n = 34)    |          | Número de isolados inibidos por <u>voriconazol</u> nas concentrações (µg/mL) |      |       |      |     |    |   |   |   |    |    |    |
|----------------------|----------|--|------|-------|------|-----|----|---|---|---|----|----|----|
|                      |          | 0,03   | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1  | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 |
| <i>T. asahii</i>     | (n = 26) | 4  | -    | -     | -    | 6   | 12 | 2 | 2 | - | -  | -  | -  |
| <i>T. asteroides</i> | (n = 05) | -  | -    | -     | -    | 2   | 1  | 2 | - | - | -  | -  | -  |
| <i>T. mucoides</i>   | (n = 01) | -  | -    | -     | -    | 1   | -  | - | - | - | -  | -  | -  |
| <i>T. ovoides</i>    | (n = 02) | -  | -    | -     | -    | 1   | -  | 1 | - | - | -  | -  | -  |
| Total                | (n = 34) | 4  | -    | -     | -    | 10  | 13 | 5 | 2 | - | -  | -  | -  |

**Tabela 12A** - Distribuição de leveduras do gênero *Trichosporon* sensíveis (S) e resistentes (R) à anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol e itraconazol segundo o NCCLS M27 – A2.

| Espécies             | n  | (% )  | Anfotericina B |          | 5-Flucitosina |          | Fluconazol |          | Itraconazol |          |    |       |    |       |
|----------------------|----|-------|----------------|----------|---------------|----------|------------|----------|-------------|----------|----|-------|----|-------|
|                      |    |       | <b>S</b>       | <b>R</b> | <b>S</b>      | <b>R</b> | <b>S</b>   | <b>R</b> | <b>S</b>    | <b>R</b> |    |       |    |       |
|                      |    |       | n              | (%)      | n             | (%)      | n          | (%)      | n           | (%)      | n  | (%)   |    |       |
| <i>T. asahii</i>     | 26 | (76)  | 7              | (27)     | 19            | (73)     | 24         | (92)     | 2           | (8)      | 0  | (0)   | 26 | (100) |
| <i>T. asteroides</i> | 05 | (15)  | 1              | (20)     | 4             | (80)     | 3          | (60)     | 2           | (40)     | 5  | (100) | 0  | (0)   |
| <i>T. mucoides</i>   | 01 | (3)   | 1              | (100)    | 0             | (0)      | 0          | (0)      | 1           | (100)    | 0  | (0)   | 0  | (0)   |
| <i>T. ovoides</i>    | 02 | (6)   | 1              | (50)     | 1             | (50)     | 2          | (100)    | 0           | (0)      | 0  | (0)   | 0  | (0)   |
| Total                | 34 | (100) | 10             | (30)     | 24            | (70)     | 29         | (85)     | 5           | (15)     | 32 | (94)  | 2  | (6)   |

\* Susceptibilidade dose-dependente

= National Committee for Clinical Laboratory Standards



**Tabela 12B** - Distribuição de leveduras do gênero *Trichosporon* sensíveis (S) e resistentes (R) ao voriconazol segundo o NCCLS M27 – A2.

| Espécies             | n  | (%)   | Voriconazol |       |   |      |
|----------------------|----|-------|-------------|-------|---|------|
|                      |    |       | S           |       | R |      |
|                      |    |       | n           | (%)   | n | (%)  |
| <i>T. asahii</i>     | 26 | (76)  | 22          | (85)  | 4 | (15) |
| <i>T. asteroides</i> | 5  | (15)  | 3           | (60)  | 2 | (40) |
| <i>T. mucoides</i>   | 1  | (3)   | 1           | (100) | 0 | (0)  |
| <i>T. ovoides</i>    | 2  | (6)   | 1           | (50)  | 1 | (50) |
| Total                | 34 | (100) | 27          | (80)  | 7 | (20) |

## **5.10. Perfil de susceptibilidade das espécies do gênero *Trichosporon* segundo o sítio de isolamento/material clínico**

A tabela 13A permite observar sensibilidade à anfotericina B apenas em uma amostra de origem de ambiente (*T. ovoides*) e uma isolada de micose superficial (*T. mucoides*). As demais amostras apresentaram resistência a este antifúngico.

Resistência à 5-flucitosina (tabela 13B) foi observada em amostras isoladas de micose superficial (*T. mucoides*), cutânea (*T. asteroides*) e sistêmica (*T. asteroides*). Enquanto a resistência ao fluconazol (tabela 13C), foi detectada apenas em amostra proveniente de micose subcutânea (*T. asahii*), resistência ao itraconazol esteve presente em amostras isoladas de todos os sítios (tabela 13D). A sensibilidade ao voriconazol (tabela 13F) esteve presente em amostras isoladas de micose superficial (*T. mucoides*), cutânea (*T. asahii*), subcutânea (*T. asteroides*) e ambiente (*T. ovoides*). As CIMs referentes à terbinafina (tabela 13E) foram menores em amostras de ambiente (*T. ovoides*) e micose superficial (*T. mucoides*) e maiores em micoses sistêmicas (*T. asahii* e *T. asteroides*), cutânea (*T. asahii*) e subcutânea (*T. asahii*).

## **5.11. Comparação das CIMs obtidas pelo método de NCCLS com as obtidas pelo E-test**

As amostras que apresentaram resistência à anfotericina B, itraconazol e 5-flucitosina através do método NCCLS foram submetidas ao E-test (fig. 31). Dez amostras de *Trichosporon* foram submetidas à comparação pelos dois métodos frente à anfotericina B (tabela 14). Destas dez amostras, somente *Trichosporon ovoides* (uma) divergiu do NCCLS quanto ao resultado, apresentou resistência pelo método do NCCLS (2 µg/mL) e sensibilidade pelo do E-test (0,75 µg/mL). Apenas duas (*T. mucoides* e *T. asahii*) dentre as seis amostras submetidas à 5-flucitosina concordaram quanto ao resultado e das 12 amostras testadas ao itraconazol, duas divergiram, sendo todas *T. asahii*, apresentando sensibilidade pelo E-test, porém resistência pelo NCCLS.

**Tabela 13A** - Susceptibilidade *in vitro* pelo método de NCCLS de *Trichosporon* spp. de acordo com o sítio de isolamento/material clínico, em relação a anfotericina B (leitura de 48 horas).

| Espécies/ sítio de isolamento | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                   |                      |                   |                    |                   |                   |                   |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                               | <i>T. asahii</i>         |                   | <i>T. asteroides</i> |                   | <i>T. mucoides</i> |                   | <i>T. ovoides</i> |                   |
|                               | CIM <sub>50</sub>        | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>    | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>  | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| Superficial                   | 4,0                      | 16                | -                    | -                 | 1,0                | 1,0               | -                 | -                 |
| Cutânea                       | 64                       | 64                | 2,0                  | 2,0               | -                  | -                 | 2,0               | 2,0               |
| Sub-cutânea                   | 64                       | 64                | 4,0                  | 4,0               | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Sistêmica                     | 2,0                      | 64                | 2,0                  | 64                | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Ambiente                      | -                        | -                 | -                    | -                 | -                  | -                 | 0,125             | 0,125             |
| Desconhecido                  | 16                       | 64                | -                    | -                 | -                  | -                 | -                 | -                 |

**Tabela 13B** - Susceptibilidade *in vitro* pelo método de NCCLS de *Trichosporon* spp. de acordo com o sítio de isolamento/material clínico, em relação a 5-flucitosina (leitura de 48 horas).

| Espécies / sítio de isolamento | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                   |                      |                   |                    |                   |                   |                   |
|--------------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                | <i>T. asahii</i>         |                   | <i>T. asteroides</i> |                   | <i>T. mucoides</i> |                   | <i>T. ovoides</i> |                   |
|                                | CIM <sub>50</sub>        | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>    | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>  | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| Superficial                    | 8,0                      | 16                | -                    | -                 | >64                | >64               | -                 | -                 |
| Cutânea                        | 4,0                      | 16                | >64                  | >64               | -                  | -                 | 8,0               | 8,0               |
| Sub-cutânea                    | 2,0                      | 2,0               | 4,0                  | 4,0               | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Sistêmica                      | 4,0                      | 16                | 8,0                  | 32                | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Ambiente                       | -                        | -                 | -                    | -                 | -                  | -                 | 2,0               | 2,0               |
| Desconhecido                   | 2,0                      | >64               | -                    | -                 | -                  | -                 | -                 | -                 |

**Tabela 13C** - Susceptibilidade *in vitro* pelo método de NCCLS de *Trichosporon* spp. de acordo com o de isolamento /material clínico, em relação ao fluconazol (leitura de 48 horas).

| Espécies / sítio<br>de isolamento | CIM (µg/mL)       |                   |                      |                   |                    |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                   | <i>T. asahii</i>  |                   | <i>T. asteroides</i> |                   | <i>T. mucoides</i> |                   | <i>T. ovoides</i> |                   |
|                                   | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>    | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>  | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| Superficial                       | 4,0               | 16,0              | -                    | -                 | 2,0                | 2,0               | -                 | -                 |
| Cutânea                           | 4,0               | 8,0               | 8,0                  | 8,0               | -                  | -                 | 8,0               | 8,0               |
| Sub-cutânea                       | 8,0               | 64                | 8,0                  | 8,0               | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Sistêmica                         | 4,0               | 8,0               | 0,5                  | 4,0               | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Ambiente                          | -                 | -                 | -                    | -                 | -                  | -                 | 0,5               | 0,5               |
| Desconhecido                      | 4,0               | 8,0               | -                    | -                 | -                  | -                 | -                 | -                 |

**Tabela 13D** - Susceptibilidade *in vitro* pelo método de NCCLS de *Trichosporon* spp. de acordo com o de isolamento/material clínico, em relação ao itraconazol (leitura de 48 horas).

| Espécies / sítio<br>de isolamento | CIM (µg/mL)       |                   |                      |                   |                    |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                   | <i>T. asahii</i>  |                   | <i>T. asteroides</i> |                   | <i>T. mucoides</i> |                   | <i>T. ovoides</i> |                   |
|                                   | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>    | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>  | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| Superficial                       | 4,0               | 8,0               | -                    | -                 | 4,0                | 4,0               | -                 | -                 |
| Cutânea                           | 16                | 64                | 2,0                  | 2,0               | -                  | -                 | 2,0               | 2,0               |
| Sub-cutânea                       | 8,0               | 64                | 8,0                  | 8,0               | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Sistêmica                         | 2,0               | 8,0               | 8,0                  | 16                | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Ambiente                          | -                 | -                 | -                    | -                 | -                  | -                 | 2,0               | 2,0               |
| Desconhecido                      | 2,0               | 16                | -                    | -                 | -                  | -                 | -                 | -                 |

**Tabela 13E** - Susceptibilidade *in vitro* de pelo método de NCCLS de *Trichosporon* spp. de acordo com o de isolamento /material clínico, em relação à terbinafina (leitura de 48 horas).

| Espécies / sítio<br>de isolamento | CIM (µg/mL)       |                   |                      |                   |                    |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                   | <i>T. asahii</i>  |                   | <i>T. asteroides</i> |                   | <i>T. mucoides</i> |                   | <i>T. ovoides</i> |                   |
|                                   | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>    | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>  | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| Superficial                       | 1,0               | 4,0               | -                    | -                 | 1,0                | 1,0               | -                 | -                 |
| Cutânea                           | 2,0               | 8,0               | 4,0                  | 4,0               | -                  | -                 | 2,0               | 2,0               |
| Sub-cutânea                       | 2,0               | 8,0               | 2,0                  | 2,0               | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Sistêmica                         | 2,0               | 8,0               | 4,0                  | 8,0               | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Ambiente                          | -                 | -                 | -                    | -                 | -                  | -                 | 0,25              | 0,25              |
| Desconhecido                      | 2,0               | 8,0               | -                    | -                 | -                  | -                 | -                 | -                 |

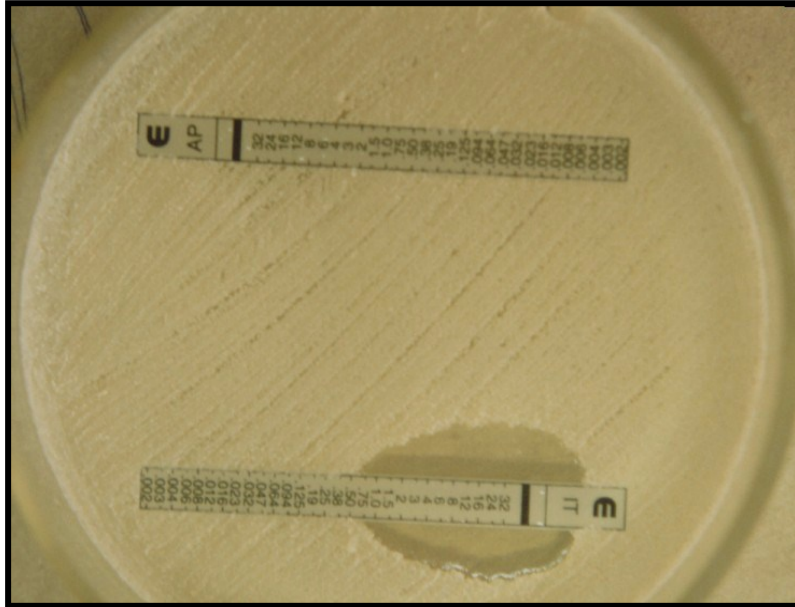
**Tabela 13F** - Susceptibilidade *in vitro* de pelo método de NCCLS de *Trichosporon* spp. de acordo com o de isolamento/material clínico, em relação ao voriconazol (leitura de 48 horas).

| Espécies/ sítio<br>de isolamento | CIM (µg/mL)       |                   |                      |                   |                    |                   |                   |                   |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                  | <i>T. asahii</i>  |                   | <i>T. asteroides</i> |                   | <i>T. mucoides</i> |                   | <i>T. ovoides</i> |                   |
|                                  | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>    | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub>  | CIM <sub>90</sub> | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| Superficial                      | 0,5               | 4,0               | -                    | -                 | 0,5                | 0,5               | -                 | -                 |
| Cutânea                          | 0,03              | 1,0               | 2,0                  | 2,0               | -                  | -                 | 2,0               | 2,0               |
| Sub-cutânea                      | 1,0               | 4,0               | 0,5                  | 0,5               | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Sistêmica                        | 0,5               | 2,0               | 1,0                  | 2,0               | -                  | -                 | -                 | -                 |
| Ambiente                         | -                 | -                 | -                    | -                 | -                  | -                 | 0,5               | 0,5               |
| Desconhecido                     | 1,0               | 1,0               | -                    | -                 | -                  | -                 | -                 | -                 |

**Tabela 14** - Comparação das CIMs obtidas de amostras de *Trichosporon* spp. pelo método de NCCLS com as do E-test (leitura de 48 horas).

|             |                | CIM (µg/mL)               |          |               |         |             |            |
|-------------|----------------|---------------------------|----------|---------------|---------|-------------|------------|
|             |                | ANFOTERICINA B            |          | 5-FLUCITOSINA |         | ITRACONAZOL |            |
|             |                | NCCLS                     | E-TEST   | NCCLS         | E-TEST  | NCCLS       | E-TEST     |
| <b>Cód.</b> | <b>Espécie</b> | <b><i>T. asahii</i></b>   |          |               |         |             |            |
| T-22        |                | R (4,0)                   | R (3,0)  |               |         | R (4,0)     | R (1,0)    |
| T-29        |                | R (4,0)                   | R (2,0)  |               |         | R (2,0)     | R (2,0)    |
| T-30        |                | R (>64)                   | R (>32)  |               |         | R (16)      | R (0,75)   |
| T-31        |                | R (>64)                   | R (>32)  | R (125)       | R (>32) | R (2,0)     | S (0,0475) |
| T-34        |                |                           |          | I (16)        | R (>32) |             |            |
| T-35        |                |                           |          |               |         | R (4,0)     | R (0,75)   |
| T-36        |                | R (16)                    | R (>32)  | I (16)        | R (>32) | R (8,0)     | R (2,0)    |
| T-37        |                | R (64)                    | R (12)   |               |         | R (8,0)     | S (0,0475) |
| T-47        |                | R (64)                    | R (>32)  | I (16)        | R (>32) | R (8,0)     | R (2,0)    |
| T-48        |                | R (64)                    | R (12)   | R (32)        | I (8,0) | R (8,0)     | R (4,0)    |
| T-55        |                |                           |          |               |         | R (8,0)     | R (2,0)    |
| T-115       |                | R (>64)                   | R (>32)  |               |         | R (>64)     | R (>32)    |
| <b>Cód.</b> | <b>Espécie</b> | <b><i>T. mucoides</i></b> |          |               |         |             |            |
| T-13        |                |                           |          | R (>250)      | R (>32) |             |            |
| <b>Cód.</b> | <b>Espécie</b> | <b><i>T. ovoides</i></b>  |          |               |         |             |            |
| T-65        |                | R (2,0)                   | S (0,75) |               |         | R (2,0)     | R (1,0)    |

Cód. = Código



**Fig. 31** – Perfil de susceptibilidade ao itraconazol e anfotericina B, em ágar Sabouraud dextrose, pelo método E-test.

## 6 - DISCUSSÃO

---

*Trichosporon* é uma levedura basidiomiceto que apresenta alto grau de relação filogenética com *Cryptococcus*. O gênero *Trichosporon* é facilmente distinguível, pela preponderância da hifa que se divide em células retangulares (artroconídeos) enquanto o gênero *Cryptococcus* se caracteriza morfológicamente pela presença de imensa cápsula e ausência de hifas. Porém, ambos produzem a enzima urease. O gênero *Geotrichum* produz propágulos similares (artroconídeos) mas difere pela ausência da enzima urease e inabilidade em assimilar um grande número de compostos de carbono. *Trichosporonoides* é um gênero que também apresenta similaridade morfológica com o gênero *Trichosporon*, produz a enzima urease mas difere ao fermentar a glicose (GUÉHO et al. 1994a; GUÉHO et al., 1994b; DE HOOG & GUARRO, 1995). Dentre as 65 amostras analisadas neste estudo, 39 foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Trichosporon* através das provas de fermentação da glicose e presença da enzima urease (figura 1; tabela 1) caracterizando o gênero estudado, tal como o realizado por Guého & De Hoog (KURTZMAN & FELL, 1998). Os resultados obtidos confirmam a precisão destas provas bioquímicas para caracterização deste gênero.

Segundo Guého et al. (1992), amostras de *Trichosporon* spp. têm sido isoladas dos mais diversos sítios de origem ambiental (solo, água e ar), alimentar (repolho, carne congelada e leite estragado) e humano (fezes, sangue, unhas, pele, urina e pêlo). Colonização por *Trichosporon* spp. é descrita por Don et al. (1995) sendo o fungo isolado de mucosa oral e região cutânea em grupo controle e de pacientes HIV positivos na mesma proporção. Os sítios de isolamento desta levedura em pacientes humanos são diversificados, porém, de acordo com os dados apresentados por Sandford et al. (1980), há maior número de casos de isolamento em urina do que em outros sítios. Sandford et al. (1980) descrevem que, dentre as sete amostras de *Trichosporon* spp. isoladas em cultura de controle de pacientes hospitalizados, seis foram isoladas de urina e apenas uma do trato respiratório. Esses resultados são compatíveis com os obtidos neste estudo no qual o sítio de maior frequência de obtenção de amostras do gênero *Trichosporon*



foi urina (35,9%) seguido de mucosa oral (12,8%) e sangue (10,26%). Unha e escama de pele obtiveram 7,70% cada, e os demais sítios (pêlo, lavado broncoalveolar, interdígito e ambiente) apresentaram a menor taxa percentual de isolamento (2,56%). Seis amostras (15,4%) eram provenientes de sítio desconhecido (tabela 2; figura 2).

A tabela 3 permite fazer a correlação entre as diferentes provas empregadas pelo método clássico de identificação. Três amostras analisadas (7,7%) não apresentaram nenhuma correlação entre os testes realizados, dezenove (48,7%) apresentaram similaridade apenas entre dois métodos e somente dezessete (43,6%) entre os três. Estes dados são reforçados pelo trabalho de Middelhoven et al. (2003), que concluíram que devido a grande similaridade fisiológica entre várias espécies do gênero é difícil a identificação pelo método clássico, sendo a habilidade de crescimento a 37°C uma alternativa para limitar o número de espécies àquelas causadoras de infecções em humanos. A capacidade de muitas espécies do gênero assimilarem uma ampla diversidade de compostos de carbono dificulta a identificação com base em testes rotineiros limitando o número de espécies possíveis de serem identificadas através do método clássico (GUÉHO et al., 1994b). Capacidade esta que foi confirmada neste estudo pela dificuldade em identificar até espécie as amostras analisadas, necessitando para tal, da correlação das características macromorfológicas e micromorfológicas das mesmas. A análise micromorfológica e até mesmo a macromorfologia da colônia gigante se mostraram com maior poder discriminatório que as provas bioquímicas, para as quais *T. asahii* e *T. asteroides* se mostraram com o mesmo perfil. Morfologicamente apenas as espécies *T. inkiin* (fig. 7B) e *T. ovoides* (fig. 8B), chamaram a atenção por apresentarem em comum a estrutura apressório. Embora ambas espécies desenvolvam esta estrutura, a mesma difere estruturalmente entre as duas espécies e também quanto à localização. *Trichosporon inkin* apresenta bifurcações disformes em suas extremidades, na porção terminal, enquanto *T. ovoides* forma apressório com aspecto semelhante a “couve-flor” ou roseta em posição intercalar. Portanto, são as duas únicas espécies que podem ser identificadas fenotipicamente através da morfologia. A

caracterização morfológica destas duas espécies é evidenciada por De Hoog & Guarro (1995) concordando com nosso estudo.

Segundo Sambrook et al. (1989), na reação de PCR, o anelamento é mais eficiente em baixas temperaturas (37°C) mas o poder discriminatório é significativamente diminuído e ocorre melhor a 50°C. Os melhores iniciadores são oligonucleotídeos acima de 16 pares de base, pelo fato de formarem híbridos estáveis na temperatura de polimerização (72°C) e requererem alta temperatura para anelamento (50°C). De acordo com Power (1996) e Sader et al. (1995), o RAPD é um método de tipagem que emprega iniciadores de pequeno tamanho, sem sequência específica e que realiza hibridização ao acaso ao iniciar a polimerização do DNA. Os iniciadores empregados neste trabalho foram oligonucleotídeos de 10 pares de base com temperatura de anelamento máxima de 35°C (dados fornecidos pelo fabricante, INVITROGEN BRASIL CUSTOM PRIMERS). Após a reação de RAPD com as amostras padrão CBS, as mesmas foram corridas em gel de agarose, com duas temperaturas diferentes (40°C e 35°C) com seis iniciadores. As reações a 40°C (figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14) produziram menor número de bandas do que a 35°C (figuras 15, 16, 17, 18, 19 e 20) para todas as espécies testadas com todos os iniciadores. Portanto, a temperatura de 35°C revelou-se excelente para as reações com as amostras a serem identificadas através do RAPD. Resultados excelentes têm sido obtidos com o emprego de iniciadores maiores como aqueles com 15 pares de base, por outros autores, como OPA15 empregado por Abliz et al. (2002) e M13 por Sugita et al. (2001a); segundo este último autor, as espécies deste gênero são filogeneticamente relacionadas, o que torna difícil a obtenção de um iniciador espécie-específico que tenha poder de discriminação satisfatório entre as espécies. Entretanto, obteve-se este resultado com OPA2 (tab. 4A; fig. 18), um iniciador de 10 pares de base, apresentando compatibilidade com a literatura (WOLF et al., 2001). O iniciador OPA2, em RAPD realizado com a amostra *T. asahii* padrão CBS produziu 6 fragmentos com 250 a 1.000 pares de base sendo este resultado compatível com o apresentado por Sugita et al. (2001), que

empregou iniciador com 15 pares de base obtendo 5 fragmentos que variaram de 330 a 1.000 pares de base.

Os genes rRNA dos fungos são repetidos em cada código genético, como 18S (small-subunit ou pequena subunidade), 5.8S e 26S (large-subunit ou grande subunidade). Duas outras regiões existem em cada repetição: a região do espaço de transcrição interna (ITS) e a região do espaço intergênico (IGS). O comprimento dos genes 18S e 26S rDNA é essencialmente idêntico em todas as espécies e o comprimento da região ITS é dependente da espécie (KUSTIMUR et al., 2002). O rDNA tem sido amplamente utilizado para a identificação de microrganismos e a região ITS empregada para a identificação de fungos patogênicos (SUGITA et al., 2002; MIDDELHOVEN, 2003; PADHYE et al., 2003).

Sugita et al. (1998b) utilizaram os iniciadores ITS1 e ITS4 e amplificaram *T. asteroides*, *T. coremiiforme* e *T. asahii* com as variedades *T. asahii* var. *faecale*. Empregou-se neste experimento os iniciadores ITS1 e ITS2 (fig. 21) com as mesmas amostras padrão CBS utilizadas pelo grupo de Sugita e obteve-se fragmentos de 550 pares de base para todas as espécies (*T. asahii*, *T. asteroides*, *T. coremiiforme*, *T. inkin*, *T. mucooides* e *T. ovoides*), resultado concordante com Sugita et al. (1998b) o que confirma que a caracterização do gênero pode ser realizada através da região ITS. A caracterização do gênero através da região ITS foi testada com 39 amostras (figuras 22 e 23) analisadas neste estudo, sendo que 34 apresentaram o mesmo número de pares de banda (550pb), os resultados obtidos no presente trabalho foram concordantes com os apresentados na literatura descrita anteriormente por Sugita et al. (1998b; 2002) e Ablitz et al., (2002).

Dentre as 34 amostras identificadas pelo RAPD com o emprego do OPA2, 26 foram identificadas como *T. asahii* (T-03, T-07, T-14, T-15, T-17, T-20, T-21, T-22, T-27, T-29, T-30, T-31, T-34, T-35, T-36, T-37, T-40, T-41, T-44, T-47, T-48, T-55, T-56, T-57, T-63, T-115) e cinco como *Trichosporon asteroides* (T-42, T-02, T-23, T-25, T-26). Como *T. ovoides* foram identificadas duas amostras (T-65 e T-08) e apenas uma foi identificada como *T. mucooides* (T-13).

Como as amostras analisadas são de origens diferentes, os perfis foram também diversos. Embora o método de RAPD tenha relativamente baixo poder discriminatório e reprodutibilidade (SADER et al., 1995), apresenta vantagens como rapidez, facilidade na execução e custo relativamente menor em comparação a outros métodos (POWER, 1996). Este método tem sido o de escolha na identificação de *Trichosporon* spp. por vários autores (SUGITA et al., 2001; ABLIZ et al., 2002) e possibilitou a identificação das amostras analisadas neste estudo com eficácia.

As tabelas 5A, 5B, 5C e 5D permitem a comparação entre os dois métodos empregados em teste de susceptibilidade às quatro drogas antifúngicas (anfotericina B, 5 - flucitosina, fluconazol e itraconazol): NCCLS (método de microdiluição em caldo) e E-test, utilizados para avaliação do perfil de susceptibilidade das seis amostras CBS (CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES) e confrontar estes dados com os disponíveis na literatura para estas mesmas amostras.

Uzun et al. (2000) analisando a susceptibilidade *in vitro* de oito amostras de *Trichosporon* encontraram sensibilidade à anfotericina (CIM<sub>50</sub> 24/48 horas de 0,5/1,0 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 24/48 de 1,0/1,0 µg/mL) divergindo dos resultados deste estudo mas concordando quanto ao fluconazol onde estes autores obtiveram sensibilidade com CIM<sub>50</sub> 24/48 horas de 2,0/4,0 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 24/48 horas de 4,0/4,0 µg/mL e, com relação ao itraconazol, SDD com CIM<sub>50</sub> 24/48 horas 0,5/0,5 µg/mL e resistência com CIM<sub>90</sub> 24/48 horas 1,0 µg/mL.

Em estudo realizado por Guého et al. (1994b), com as mesmas amostras CBS (*T. asahii*, *T. asteroides*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides*), o resultado obtido através do NCCLS demonstrou sensibilidade à anfotericina B, itraconazol e fluconazol para todas as cinco amostras testadas por este grupo, divergindo dos resultados apresentados neste experimento, tanto no perfil de susceptibilidade quanto na CIM obtida. Os resultados obtidos neste experimento, com *T. asahii*, para fluconazol foram compatíveis com os de Wolf et al. (2001) em ambos os métodos (tabela 5C) categorizando a amostra como resistente, assim como também foi convergente o resultado apresentado como resistente por este autor

para itraconazol (E-test 1,0 µg/mL) e sensibilidade à anfotericina B (tab. 5A) (0,25 µg/mL pelo NCCLS e 0,125 µg/mL pelo E-test).

Quanto à 5 – flucitosina, Guého et al. (1994b) encontraram sensibilidade (CIM 12,5 µg/mL) em *T. inkin* compatível com os dados obtidos neste estudo (CIM 2,0 µg/mL) embora haja grande variação da CIM entre os resultados; a concordância entre o perfil de susceptibilidade e CIM foi observada apenas para *T. mucoides* e *T. ovoides* entre nosso experimento (tabela 5B) e este grupo. Guého et al. (1994) obtiveram resistência (>50 µg/mL) em *T. asahii*, resultado este (128 µg/mL) compatível com Wolf et al. (2001) e discordante com o presente estudo (2,0 µg/mL). *Trichosporon asteroides* e *T. coremiiforme* não foram testados quanto a sensibilidade a essa droga por Guého et al. (1994) e Wolf et al. (2001) analisaram apenas *T. asahii* (foi comparada apenas a CBS 2479). As demais amostras de *T. asahii* CBS analisadas por Wolf et al. (2001) apresentaram resistência à anfotericina B, itraconazol, e 5 – flucitosina e quatro das outras seis por investigadas por esses autores apresentaram resistência ao fluconazol.

Estas comparações possibilitam observar as diferenças das CIMs que cada grupo obtêm com as mesmas amostras e ressaltar a importância da conduta padronizada intralaboratório, uma vez que os resultados alcançados neste experimento foram compatíveis aos obtidos por Wolf et al. (2001) com duas drogas (anfotericina B e fluconazol) pelo método do NCCLS em que a técnica da leitura da CIM foi realizada através do sistema visual enquanto Guého et al. (1994b) empregaram sistema automatizado apresentando, portanto, maior divergência.

A tabela 6 mostra a variação das CIMs para as amostras CBS do gênero *Trichosporon* frente à terbinafina, que varia de 0,03 µg/mL (*T. asahii*) a 8,0 µg/mL (*T. inkin*). *Trichosporon ovoides* e *T. coremiiforme* apresentaram CIM de 2,0 µg/mL frente a esta droga. A média geométrica para terbinafina relatada por Ryder (1999) para *Candida albicans* é de 1,4 µg/mL. A concentração inibitória mínima de 90% das amostras CBS analisadas em leitura de quarenta e oito horas foi de 8,0 µg/mL, resultado próximo daquele obtido pelo autor com *C. albicans* isoladas de

candidoses cutâneas (4,0 µg/mL) e inferiores aos alcançados por ele com *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos (>128 µg/mL).

O perfil de susceptibilidade frente ao voriconazol (tabela 7) com as amostras CBS revela uma variação das CIMs de 0,25 µg/mL (*T. mucoides* e *T. ovoides*) a 4,0 µg/mL (*T. inkin*). Segundo os valores recomendados pelo NCCLS M27 – A2, a sensibilidade ocorre em valores menores ou iguais à 1,0 µg/mL, portanto *T. inkin* apresentou resistência ao voriconazol.

Os resultados apresentados na tabela 8 das amostras submetidas ao voriconazol (CIM<sub>50</sub> 24/48 horas de 0,5/1,0 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 24/48 horas de 1,0/2,0 µg/mL) quando comparados aos relatados por Uzun et al. (2000) na tabela 7 (variação de CIM 24 horas ≤0,015 – 0,06 µg/mL e CIM de 48 horas de 0,03 – 0,06 µg/mL) surpreendem por apresentarem valores mais de 30 vezes superiores.

Houve compatibilidade quanto a anfotericina B com os resultados obtidos neste trabalho (tabela 8) com Hajjeh & Blumberg (1995), no relato de primeiro caso de tricosporonose da corrente sanguínea da qual isolaram *Trichosporon* sp. com CIM 24/48 horas de 0,56/9,24 µg/mL a essa droga. Os dados obtidos neste experimento também foram compatíveis com relação ao itraconazol com CIM 24/48 horas de 1,25 µg/mL e divergiram quanto ao fluconazol com CIM 24/48 de 80 µg/mL e 5-flucitosina com CIM 24/48 horas de ≤ 0,09 µg/mL.

Susceptibilidade variável à anfotericina B tem sido observada com amostras deste gênero, entretanto o teste de susceptibilidade em isolados do gênero *Trichosporon*, especialmente de pacientes imunocomprometidos, poderiam resultar numa melhor conduta na terapia antifúngica. Em experimento com animal granulocitopênico inoculado com *Trichosporon* spp., o tratamento com anfotericina B e anfotericina B associada à 5-flucitosina foram ineficazes. Por outro lado, fluconazol revelou-se ativo indicando que azólicos podem ser a opção válida na terapia desta infecção, comumente refratária a tratamento (GUÉHO et al., 1994b).

O primeiro *T. asteroides* isolado de fungemia foi de uma paciente com 75 anos de idade, com disfunção respiratória e as amostras foram isoladas de urina, sangue, cateter e líquido do tubo endotraqueal. O teste de susceptibilidade

mostrou sensibilidade a todos os antifúngicos, com CIM <0,0312 para a anfotericina B, <0,125 para fluconazol, <0,0625 para itraconazol (KUSTIMUR et al., 2002). Esses resultados concordam com os dados obtidos neste experimento apenas quanto ao fluconazol (tabela 9C).

Com o objetivo de prevenir a colonização fúngica e infecção invasiva em crianças de baixo peso, Kaufman et al. (2001) conduziram um estudo prospectivo empregando fluconazol como agente profilático por 6 semanas. O grupo tratado com fluconazol era constituído de 50 crianças sendo que nenhuma amostra de *Trichosporon* foi isolada desses pacientes. Já nas 50 crianças do grupo placebo, duas amostras de *T. mucoides* foram isoladas, confirmando a efetividade deste azólico. A sensibilidade de *T. mucoides* ao fluconazol é comprovada pela literatura, assim como ao voriconazol, o que reforça os resultados obtidos neste estudo, que concordaram com os de Gökahmetoglu et al., (2000) e divergiram de Nettles et al. (2003) quanto à anfotericina (tabelas 9A, 9F). *Trichosporon mucoides* foi isolado da corrente sanguínea de três neonatos prematuros e todas as amostras foram sensíveis à anfotericina B (CIM 0,016 µg/mL) e ao fluconazol (CIM 12 µg/mL). Dois neonatos foram tratados com anfotericina B e um com fluconazol, ambos com sucesso (GÖKAHMETOGLU et al., 2000). Nettles et al. (2003) relataram um caso de infecção disseminada por *T. mucoides* em paciente transplantado cardíaco e renal, cuja CIM para anfotericina B (2 µg/mL) demonstrou resistência e sensibilidade aos azólicos (8 µg/mL para fluconazol; 0,125 µg/mL para itraconazol e 0,5 µg/mL para voriconazol).

O perfil de susceptibilidade das amostras de *T. asahii* isoladas por Panagopulou et al. (2002) e Yang et al. (2003) foram discordantes daqueles obtidos com as amostras deste estudo quanto ao resultado obtido frente à anfotericina B, CIM 1,0 µg/mL e 0,25µg/mL, respectivamente e concordantes quanto à 5-flucitosina, (CIM 8,0 µg/mL e 2µg/mL) e fluconazol, (CIM 1,0 µg/mL e SDD 16 µg/mL). Yang et al. (2003) isolaram *T. asahii* de uma paciente de 20 anos de idade com tricosporonose disseminada (amostra foi isolada de lesões na derme e no tecido subcutâneo e também no fígado), após tratamento inicial com anfotericina B associada com 5-flucitosina e posteriormente com anfotericina B

associada ao fluconazol. A paciente se recuperou mostrando a eficácia da segunda combinação. Panagopoulou et al. (2002) isolaram *T. asahii* em corrente sanguínea de neonato de baixo peso, com colonização da faringe e períneo. Nos dois grupos, o perfil de susceptibilidade auxiliou na escolha do tratamento antifúngico, sendo empregado com sucesso anfotericina B, em ambos os casos. Esta observação é validada pelo caso clínico descrito por Chakrabarti et al. (2001) que relataram um caso de linfadenite por *T. asahii* em indivíduo com síndrome de Job (eosinofilia com IgE elevada) cuja amostra apresentou resultado concordante com os obtidos com essa espécie neste estudo, apresentando resistência à anfotericina B (CIM 4µg/mL) e ao itraconazol (CIM 0,25µg/mL) e sensibilidade ao fluconazol (CIM 16 µg/mL) e 5-flucitosina (CIM 8 µg/mL). O paciente foi tratado com itraconazol por 28 dias, sem mudança do quadro quando então foi ministrado anfotericina B por 4 semanas, com regressão dos linfonodos para menos que 1/5 do tamanho original e diminuição da contagem de eosinófilos. Após um intervalo de quatro semanas, o paciente retornou com aumento progressivo dos linfonodos e terapia com anfotericina B associada com 5-flucitosina foi iniciada sem mudança do quadro sendo que o paciente foi a óbito. Este relato ressalta a importância de haver um apoio laboratorial em tempo hábil para auxiliar na terapia antifúngica, tanto na escolha da droga quanto na concentração a ser administrada logo no início do tratamento. *Trichosporon asahii* é a espécie mais frequente em infecções em humanos, principalmente na ocorrência de infecções graves e a rápida identificação da espécie, com realização do teste de susceptibilidade, assim como a comunicação urgente entre o microbiologista e o infectologista, propiciam o início do tratamento de maneira apropriada (PANAGOPOULOU et al., 2002).

A tabela 13A permite observar sensibilidade à anfotericina B apenas em uma amostra de ambiente (*T. ovoides*) e uma foi isolada de micose superficial (*T. mucoides*). As demais amostras foram resistentes a este antifúngico. Embora não se possa afirmar correspondência destes resultados com os de Walsh et al. (FRIDKIN & JARVIS, 1996), no qual isolados sanguíneos foram mais resistentes a anfotericina B que os isolados de pele, chama a atenção a inexistência de sensibilidade em isolados de micoses cutâneas, subcutânea e sistêmicas.



Segundo Anaissie (1992), tricosporonose e fusariose são sempre fatais em neutropenias graves e persistentes. *Trichosporon* spp. relativamente resistentes à anfotericina B têm sido relatados. De 25 pacientes neutropênicos graves com tricosporonose disseminada, 21 morreram devido à infecção. O sucesso do tratamento com fluconazol em 5 pacientes com câncer, incluindo um com tricosporonose disseminada, encoraja o uso de azólicos.

Em casos de infecção disseminada por *Trichosporon* spp. terapia prolongada pode ser necessária e fluconazol é provavelmente mais efetivo que a anfotericina B, quando administrada para tratamento, mas o uso de ambos agentes em associação para infecções graves tem sido considerado (PERFECT & SCHELL, 1996).

Lussier et al. (2000) descreveram tricosporonúria em 11 pacientes transplantados renais no Hospital Maisonneuve – Rosemont, Université de Montréal, Quebec, Canadá. O isolamento de *Trichosporon* spp. foi repetido em sete destes pacientes. Seis pacientes foram tratados com drogas antibacterianas e dois desenvolveram infecção invasiva do trato urinário por este agente, que apresentou sensibilidade à anfotericina B (CIM 1,0 e 0,5 µg/mL), 5-flucitosina (8,0 e 0,06 µg/mL), itraconazol (0,5 e 0,016 µg/mL) e fluconazol (4 e 2 µg/mL). Um dos pacientes teve falência renal e precisou retirar o órgão. Ambos os pacientes fizeram terapia com fluconazol, com sucesso.

A comparação das CIMs obtidas de amostras de *Trichosporon* spp. pelo método de NCCLS com as do E-test, embora não divergissem totalmente quanto ao resultado (sensível ou resistente) apresentaram diluições maiores para 5-flucitosina e itraconazol, porém com CIMs mais próximas entre os dois métodos, para anfotericina B. Estes resultados concordaram com os apresentados por Arikam & Hasçelik (2002) cujo trabalho desenvolvido com anfotericina B, itraconazol e fluconazol apresentou também variação de mais ou menos uma diluição. Wolf et al. (2001) obtendo resultados concordantes com os de Arikam & Hasçelik (2002) e os deste estudo ressaltam a excelente relação entre estes dois métodos e indica o E-test como um método aceitável para determinação das CIMs.

Tricosporonose aparece sendo uma doença de difícil tratamento e associada com dados de alta morbidade e mortalidade. Embora a susceptibilidade *in vitro* nem sempre seja correlacionada com a resposta *in vivo*, a revisão na literatura denota o contrário, quando a opção da terapia é baseada no perfil de susceptibilidade da amostra isolada (PANAGOPULOU et al., 2002; YANG et al., 2003).

A falha clínica com os agentes antifúngicos disponíveis para tricosporonose sistêmica não é rara. Estes dados são obtidos do perfil de susceptibilidade “*in vitro*” de isolados clínicos de *Trichosporon*. Porém, padronização de métodos de susceptibilidade e de pontos de corte de CIM não foram ainda determinados (ARIKAN & HASÇELIK, 2002).

## 7. CONCLUSÕES

---

1 - O método clássico mostrou-se eficaz na caracterização do gênero *Trichosporon* e na identificação das principais espécies deste gênero, exceto na diferenciação entre *T. asahii* e *T. asteroides*.

2 – A observação das características morfológicas (macro e micro) empregadas no método clássico mostraram-se mais eficazes que as provas bioquímicas na identificação das espécies de *Trichosporon*. As características micromorfológicas de *T. ovoides* e *T. inkin* são inconfundíveis tornando sua identificação evidente.

3 - A caracterização por amplificação da região ITS foi útil para identificação presuntiva das espécies oportunistas do gênero *Trichosporon*, com sensibilidade superior à realizada através do método clássico.

4 – O iniciador OPA 2 possibilitou a identificação das espécies de *Trichosporon* das amostras analisadas através da comparação com as amostras padrão CBS.

5 – O RAPD auxiliou o método clássico, na identificação das espécies de *Trichosporon*.

6 - Ocorreu predomínio de *T. asahii*, 26 dentre 34 amostras identificadas, sobre as outras espécies: *T. asteroides* (05), *T. mucooides* (01) e *T. ovoides* (02).

7 - Houve alta frequência de amostras de *Trichosporon* isoladas em urina (35,9%), e baixa frequência de amostras isoladas de pêlos (2,56%).

8 – A avaliação do gênero *Trichosporon* frente aos antifúngicos testados revelou, como um todo, o padrão de sensibilidade ao fluconazol, resistência ao itraconazol e à anfotericina B, e baixa resistência à 5-flucitosina.

9 - A avaliação das espécies do gênero *Trichosporon* frente aos antifúngicos testados revela em todas as espécies o perfil de resistência ao itraconazol e sensibilidade ao fluconazol, apenas *T. mucoides* foi sensível à anfotericina B e ao voriconazol.

10 – A maior variação da CIM para terbinafina foi observada em *T. asteroides* e a menor, em *T. ovoides*.

11 – A comparação entre os métodos NCCLS e E-test realizada com as amostras analisadas que apresentaram resistência através do NCCLS, revelou alta similaridade nos resultados entre os métodos quanto à anfotericina B, e grande divergência quanto ao itraconazol e 5-flucitosina.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABLIZ, P.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; YANG, R.; LI, R.; NISHIMURA, K. – Identification of the first isolates of *Trichosporon asahii* var. *asahii* from disseminated trichosporonosis in China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 44, p. 17-22, 2002.
- AL-HEDAITHY, S. S. A. – The yeast species causing fungemia at a university hospital in Riyadh, Saudi Arabia, during a 10-year period. *Mycoses*, v. 46, p. 275-280, jan. 2003.
- ALEXANDER, B. D. – Diagnosis of fungal infections: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl. Infect. Dis.*, v. 4, s. 3, p. 32-37, 2002.
- ANAISSE, E. - Opportunistic Mycoses in the Immunocompromised Host: Experience at a Cancer Center and Review. *Clin. Infect. Dis.*, v. 14, s. 1, p. 43-53, 1992.
- ARCHER-DUBON, C.; OROZCO-TOPETE, R.; LEYVA-SANTIAGO, J.; ARENAS, R.; CARBAJOSA, J.; YSUNZA, A. – Superficial Mycotic Infections of Foot in a Native Pediatric Population: A Pathogenic Role for *Trichosporon cutaneum*? *Ped. Dermatol.* v. 20, n. 4, p. 299-302, 2003.
- ARIKAN, S.; HASÇELIK, G. – Comparison of NCCLS microdilution method and Etest in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 43, p. 107-111, 2002.
- CHAKRABARTI, A.; NAYAK, N.; KUMAR, P. S.; TALWAR, P.; CHARI, P. S.; PANIGRAHI, D. – Surveillance of Nosocomial Fungal Infections in a Burn Care Unit. *Infect.* v. 20, n. 3, p. 22/132-135/25, 1992.

- CHAKRABARTI, A.; MARHAWA, R. K.; MONDAL, R.; TREHAN, A.; GUPTA, S.; RAMAN RAO, D. S. V.; SETHI, S.; PADHYE, A. A. – Generalized lymphadenopathy caused by *Trichosporon asahii* in a patient with Job's syndrome. *Med. Mycology*, v. 40, p. 83-86, 2002.
- CHANG, S. E.; KIM, K. J.; LEE, W. S.; CHOI, J. H.; MOON, K. C.; KOH, J. K. – A case of *Trichosporon cutaneum* folliculitis and sepsaemia. *Clin. Dermatol.*, v. 28, p. 37-38, 2003.
- CHAUMETIN, G.; BOIBIEUX, A. ; PIENS, M. A. ; DOUCHET, C.; BUTTARD, P.; BERTRAND, J. L.; PEYRAMOND, D. - *Trichosporon inkin* Endocarditis: Short-Term Evolution and Clinical Report. *Clin. Infect. Dis.*, v. 23, p. 396-7, aug. 1996.
- COLOMBO, A. L.; BARCHIESI, F.; MCGOUGH, D. A.; and RINALDI, M. G. Comparison of E test and National Committee for Clinical Laboratory standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 535-540, 1995.
- CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2, 1998, Rio de Janeiro. - *Aplicação do Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) na identificação de espécies do gênero Trichosporon*. Rio de Janeiro.
- DE HOOG, G. S. & GUARRO, J. Basidiomycetous yeasts. Genus: *Trichosporon*. In: DE HOOG, G. S. & GUARRO, J. P. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. p. 251-220.
- DE HOOG, G. S. & GUARRO, J. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. 720 p.

- DEPREE, J.; EMERSON, G. W.; SULLIVAN, P. A. - The cell wall of the oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 139, p. 2113-33, 1993.
- DERMOUMI, H. - In Vitro Susceptibility of Yeast Isolates from the Blood to Fluconazole and Amphotericin B. *Chemother.*, v. 38, p. 112-117, 1992.
- DIB, J. C.; DUBE, M.; KELLY, C.; RINALDI, M. G; PATTERSON, J. E. - Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a Typing System fo *Candida rugosa*: Comparison of Karyotype and Restriction Fragment Length Polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, n. 6, p. 1494-96, 1996.
- DON, P. C.; SHEN, N. N.; KOESTENBLATT, E. K.; SIERRA, M. F.; STONE, R. K.; BAMJI, M. - Mucocutaneous Fungal Colonization in HIV-infected Children. *Acta Derm. Venereol.*, v. 75, p. 310-11, 1995.
- DOUGLAS, L. J. - Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. *Microbiol. Sc.*, v. 2, n. 8, p. 243-47, 1985.
- ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; HAZEN, K. C.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; SCALISE, G. - Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Med. Mycol.*, v. 36, s. 1, p. 68-78, 1998a.
- ESPINEL-INGROFF, A.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.; PINCUS, D.; POLLACK, J.; MARLER, J. - Comparison of Rapid Yeast Plus System with API 20C System for Identification of Common, New, and Emerging Yeast Pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 4, p. 883-86, apr. 1998b.
- FARINA, C.; VAILATI, F.; MANISCO, A.; GOGLIO, A. - Fungaemia survey: a 10 - year experience in Bergamo, Italy. *Mycoses*, v. 42, p. 543-8, 1999.

- FRIDKIN, S. K. & JARVIS, W. - Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 9, n. 4, p. 499-511, oct. 1996.
- GIUSIANO, G. E.; MANGIATERRA, M. L. - [Rapid differentiation and presuntive identification of yeasts using Candida CHROM-agar medium]. *Rev. Argent. Microbiol.*, v. 30, n. 2, p. 100-3, apr-jun. 1998.
- GHÉRO, E.; FAERGEMANN, J.; LYMAN, C.; ANAISSIE, E. J. - *Malassezia* and *Trichosporon*: two emerging pathogenic basidiomycetous yeast-like fungi. *J. Med. and Vet. Mycol.*, v. 32, s. 1, p. 367-78, 1994a.
- GUÉHO, E.; IMPROVISI, L.; HOOG, G. S.; DUPONT, B. - *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses*, v. 37, p. 3-10, 1994b.
- GHÉHO, E.; SMITH, M. TH.; HOOG, G. S.; BILLON-GRAND, G.; CHISTEN, R.; BATENBURG-VAN der VEGTE, W. H. - Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 61, p. 289-316, 1992.
- GUÉHO, E.; SMITH, M. TH.; HOOG, G. S. - *Trichosporon* Behrend. In: KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. – The Yeasts, A Taxonomic Study. 4<sup>ed</sup>. Elsevier, 1998. cap. 110, p. 854-72.
- GÖKAHMETOĞLU, S.; NEDRET KOÇ, A.; GÜNES, T.; ÇETIN, N. – Case Reports. *Trichosporon mucooides* infection in three premature newborns. *Mycoses*, v. 45, p. 123-125, 2002.
- HADLEY, S.; MARTINEZ, J. A.; McDERMOTT, L.; RAPINO, B.; SNYDMAN, D. R. - Real-time antifungal susceptibility screening aids management of invasive yeast infections in immunocompromised patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 49, n. 2, p. 415-19, feb. 2002.



- HAJJEH, R. A.; BLUMBERG, H. M. - Bloodstream Infection due to *Trichosporon beigelli* in a Burn Patient: Case Report and Review of Therapy. *Clin. Infect. Dis.*, v. 20, p. 913-6, 1994.
- HAZEN, C. K. - New and Emerging Yeast Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 8, p. 462-78, oct. 1995.
- HIRAKATA, Y.; KATOH, T.; ISHII, Y.; KITAMURA, S.; SUGIYAMA, Y. – *Trichosporon asahii* – induced asthma in a family with Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Ann. Allergy Immunol.*, v. 88, p. 335-338, mar. 2002.
- HOPFER, L. - Use of Molecular Biological Techniques in the Diagnostic Laboratory for Detecting and Differentiating Fungi. *Arch. Med. Res.*, Mexico, v. 26, n. 3, p. 287-92, 1995
- HSU, C. F.; WANG, C. C.; HUNG, C. S.; CHENG, S. N.; CHEN, Y. H.; CHU, M. L. - *Trichosporon beigelli* causing oral mucositis na fungemia: report one case. *Chung Hua Min Kuo Hsiao Erh Ko I Hsueh Hui Tsa Chih*. V. 39, n 3, p. 191-4, may-jun. 1998. Resumo.
- ITOH, T.; HOSOKAWA, H.; KOHDERA, U.; TOYAZAKI, N.; ASADA, Y. - Disseminated infections with *Trichosporon asahii*. *Mycoses*, v. 39, p. 195-99, 1996.
- KAM, A. P.; XU, JIANPING. – Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 43, p. 19-28, 2002.
- KAMI, M.; MACHIDA, U.; OKUZUMI, K.; MATSUMURA, T.; MORI, S.; HORI, A.; KASHIMA, T.; KANDA, Y.; TAKAUE, Y.; SAKAMARI, H.; HIRAI, H.; YONEYAMA, A.; MUTOU, Y. – Effect of fluconazole prophylaxis on fungal

blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with haematological malignancy. *British J. Haematol.*, v. 117, p. 40-46, 2002.

KAUFMAN, D.; BOYLE, R.; HAZEN, K. C.; PATRIE, J. T.; ROBINSON, M.; DONOWITZ, G. – Fluconazole Prophylaxis Against Fungal Colonization and Infection in Preterm Infants. *N. Engl. J. Med.*, v. 345, n. 23, p. 1660-66, dec. 2001.

KIMURA, M.; TAKAHASHI, H.; SATOU, T.; HASHIMOTO, S. - An autopsy case of disseminated trichosporonosis with candidiasis of the urinary bladder. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, v. 416, p. 159-162, 1989.

KITCH, T. T.; JACOBS, M. R.; McGUINNIS, M. R.; APPELBAUM, P. C. - Ability of RapID Yeast Plus System To Identify 304 Clinically Significant Yeasts within 5 Hours. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, n. 5, p. 1069-71, may. 1996.

KREMERY, V.; KRUPOVA, I.; DENNING, D. W. - Invasive yeast infections other than *Candida* spp. In acute leukaemia. *J. Hosp. Infect.*, v. 41, n. 3, p. 181-94, mar. 1999a.

KREMERY, V. Jr.; ORAVCOVA, E.; SPANIK, S.; MRAZOVA-STUDENA, M.; TRUPL, J.; KUNOVA, A.; STOPKOVA-GREY, K.; KUKUCHOVA, E.; KRUPOVA, L.; DEMITRICOVA, A.; KRALOVICOVA, K. - Nosocomial breakthrough fungaemia during antifungal prophylaxis or empirical antifungal therapy in 41 cancer patients receiving antineoplastic chemotherapy: analysis of aetiology risk factors and outcome. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 41, p. 373-80, mar. 1998.

KREMERY, V. Jr.; MATEICKA, F.; KUNOVA, A.; SPANIK, S.; GYARFAS, J.; SYCOVA, Z.; TRUPI, J. - Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. *Support Care Cancer*, v. 7, n. 1, p. 39-43, jan. 1999b.

KREGER - VAN RIJ, N. J. W. - *The Yeast A Taxomic Study*. 3rd ed., 1984.  
Science Publishers, B.V. Amsterdan: Elsevier, 1081 p.

KURTZMAN, P. C. & FELL, J. W. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 4rd ed., 1998.  
1055 p.

KUSTIMUR, S.; KALKANCI, A.; CAGLAR, K.; DIZBAY, M.; AKTAS, F. –  
Nosocomial fungemia due to *Trichosporon asteroides*: firstly described  
bloodstream infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 43, p. 167-170, 2002.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. - Morfologia e Biologia dos Fungos  
de Interesse Médico. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.  
Micologia Médica - Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico. 8ª ed.  
São Paulo: Ed. Sarvier, 1991. Cap.2 p. 31-58

LASCAUX, A. S.; BOUSCARAT, F.; DESCAMPS, V.; CASALINO, E.;  
PICARDDAHAN, C.; CRICKX, B.; BELAICH, S. - [Cutaneous manifestations  
during disseminated trichosporonosis in an AIDS patient]. *Ann. Dermatol.*  
*Venereol.*, v. 125, n. 2, p. 111-3, feb. 1998.

LEHMANN,P.F.; LIN, D. & LASKER, B.A. - Genotypic Identification and  
Characterization of Species and Strains within the Genus *Candida* by Using  
Random Amplified Polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 12, p. 3249-  
54, 1992.

LEVITZ, S. M. - Overview of Host in Fungal Infections. *Clin. Infect. Dis.*, v. 14, s. 1,  
p. 37-42, 1992.

- LOPES, J. O.; ALVES, S. H.; KLOCK, C.; OLIVEIRA, L. T. O.; DAL FORNO, N. R. F. - *Trichosporon inkin* peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis with bibliography review. *Mycopathol.*, v. 139, p. 15-18, 1997.
- LUSSIER, N.; LAVARDIÈRE, M.; DELORME, J.; WEISS, K.; DANDAVINO, R. – *Trichosporon beigelli* Funguria in Renal Transplant Recipients. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, p. 1299-301, nov. 2000.
- MAYSER, P.; HUPPERTZ, M.; PAPAVALASSILIS, C.; GRÜNDER, K. – Yeasts of the genus *Trichosporon*. Identification, epidemiology and significance in dermatological disease. *Hautarzt*, v. 47, p. 913-20, 1996.
- MIDDELHOVEN, W. J. – Identification of clinically relevant *Trichosporon* species. *Mycoses*, v. 46, p. 7-11, 2003.
- MIDDELHOVEN, W. J.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W. - *Trichosporon guehoae* sp. Nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. *Can. J. Microbiol.*, v. 45, n. 10, p. 686-90, oct. 1999. Resumo.
- MIDDELHOVEN, W. J.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W. – Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. *J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 54, p. 975-986, 2004.
- MOOTY, M.Y.; KAMJ, S. S.; OBEID, M. Y.; HASSAN, G. Y.; ARAJ, G. F. – A Case os *Trichosporon beigelli* Endocarditis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 20, n. 2, p. 139-42, feb. 2001.
- MORIMOTO, S.; SHIMAZAKI, C.; GOTO, H.; HIRATA, Y.; TATSUMI, T.; YAMAGATA, N.; HIRATA, T.; ASHIHARA, E.; INABA, T.; FUJITA, N.; NAKAGAWA, M. - *Trichosporon cutaneum* fungemia in patients with acute

myeloblastic leukemia and measurement of serum D-arabinitol, *Candida* antigen (CAND-TEC), and  $\beta$ -D-glucan. *Ann. Hematol.*, v. 68, p. 159-61, 1994.

MULLER , F. C.; WERNER, K. E.; KASAI, M.; FRANCESCONI, A.; CHANOCK, S. J.; WALSH, T. J. – Rapid Extraction of Genomic DNA from Medically Important Yeasts and Filamentous Fungi by Hight-Speed Cell Disruption. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 1625-29, jun. 1998.

NAGAI, H.; YAMAKAMI, Y.; HASHIMOTO, A.; TOKIMATSU, I.; NASU, M. - PCR detection of DNA specific for *Trichosporon* species in serum of patients with disseminated trichosporonosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, n. 3, p. 694-9, mar. 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Publication of M27-A2. - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Second Edition. *NCCLS*, v. 22, n. 15, p. 1-29, Aug. 2002.

NETTLES, R. E.; NICHOLS, L. S.; BELL-McGUINN, K.; PIPELING, M. R.; SCHEEL, P. J.; MERZ, W. G. - Successful Treatment of *Trichosporon mucoides* Infection with Fluconazole in a Heart and Kidney Transplant Recipient. *Clin. Infect. Dis.*, v. 36, p. 63-6, 2003.

NOSKIN, G. A.; LEE, G.; HACEK, D. M.; POSTELNICK, M.; REISBERG, B. E.; STOSOR, V.; WEITZMAN, S. A.; PETERSON, L. R. - Molecular Typing for Investigating an Outbreak of *Candida krusei*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 26, p. 117-123, 1996.

NUCCI, M.; PULCHERI, W.; SPECTOR, N.; BUENO, A. P.; BACHA, P. C.; CAIUBY, M. J.; DEROSI, A.; COSTA, R.; MORAIS, J. C.; OLIVEIRA, H. P. -

- Fungal Infections in Neutropenic patients. A 8-Year Prospective Study. *Rev. Inst. Med. trop.*, v. 37, n. 5, p. 397-406, set./out. 1995.
- ODDS, F. & BERNAERTS, R. - CHROMagar Candida, a new Differential Isolation Medium for Presuntive Identification of Clinically Important *Candida* Species. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, n. 8, p. 1923-29, Aug. 1994.
- PADHYE, A. A.; VERGHESE, S.; RAVICHANDRAN, P.; BALAMURUGAN, G.; HALL, L.; PADMAJA, P.; FERNANDEZ, M. C. - *Trichosporon loubieri* Infection in a Patient with Adult Polycystic Kidney Disease. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 1, p. 479-82, jan. 2003.
- PANAGOPOULOU, P.; EVDORIDOU, J.; BIBASHI, E.; FILIOTI, J.; SOFIANOU, D.; KREMEPOULOS, G.; ROILIDES, E. – *Trichosporon asahii*: an Unusual Cause of Invasive Infection in Neonates. *Ped. Infect. Dis. J.*, v. 21, n. 2, p. 169-170, feb. 2002.
- PAYNE, A. L.; TEALL, A. J. - *Trichosporon beigelli* - Infection in an Immunocompromised Host. *Mycoses*, v. 32, n. 4, p. 183-86, feb. 1989.
- PERFECT, J. R. & SCHELL, W.A. - The New Fungal Opportunists Are Coming. *Clin Infect. Dis.*, v. 22, s. 2, p. 112-8, 1996.
- PFALLER, M. A. - Epidemiology and Control of Fungal Infections. *Clin. Infect. Dis.*, v. 19, s. 1, p. 8-13, 1994.
- PFALLER, M. A. - Epidemiology of Fungal Infections: The Promise of Molecular Typing. *Clin. Infect. Dis.*, v. 20, p. 1535-9, 1995a.
- PFALLER, M. A. - Epidemiology of Fungal Infections: Current Perspectives and Future Directions. *Clin. Infect. Dis.*, v. 20, p. 1525, 1995b.

- PIWOZ, J. A.; STADTMAUER, G. J.; BOTTONE, E. J.; WEITZMAN I.; SHLASKO, E.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. - *Trichosporon inkin* Lung Abscesses Presenting as a Penetrating Chest Wall Mass. *Ped. Infect. Dis J.*, v. 19, n. 10, p. 1025-27, oct. 2000.
- POWER, E. G. M. - RAPD typing in microbiology - a technical review. *J. Hosp. Infect.*, v. 34, p. 247-65, 1996.
- REX, J. H.; PFALLER, M. A.; RINALDI, M. G.; POLAK, A.; GALGANI, J. N. - Antifungal susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, p. 367-381, 1993.
- RIPPON, J. W. - Opportunistic Infections. In: RIPPON, J. W. *Medical Mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Philadelphia, W. B. Saunders, 1988. Cap. 20, p. 532-36.
- RYDER, N. S. - Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. *Mycoses*, Vienna, v. 42, s. 2, p. 115-119, 1999.
- SADER, H.S.; HOLLIS, R.J. & PFALLER, M.A. - The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin. Lab. Med.*, v. 15, n. 2, p. 407-31, jun. 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. and MANIATS, T. - *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAME-EKOBO, A.; LOHOUE, J.; MBASSI, A. - [A clinical and biological study of parasitic and fungal diarrhea in immunosuppressed patients in an urban and suburban area of Yaounde]. *Sante*, v. 7, n. 6, p. 349-54, nov.-dec. 1997.

SANDFORD, G. R.; MERZ, W. G.; WINGARD, J. R. ; CHARACHE, P.; SARAL, R.  
- The Value of Fungal Surveillance Cultures as Predictors of Systemic Fungal Infections. *J. Infect. Dis.*, v. 142, n. 4, p.503-9, oct. 1980.

SANDHU, G. S.; KLINE, B. C.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D. - Molecular Probes for Diagnosis of Fungal Infections. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, n. 11, p. 2913-19, 1995.

SCHWAB, U.; CHERNOMAS, F.; LARCOM, L. and WEENS, J. - Molecular Typing and Fluconazole Susceptibility of Urinary *Candida glabrata* Isolates from Hospitalized Patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 28, p. 11-17, 1997.

SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, A .  
Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *Yeast Research*, v. 2, p. 495-517, 2002.

SHADZI, S.; CHADEGANIPOUR, M. - Isolation of opportunistic fungi from bronchoalveolar lavage of compromised hosts in Isfahan, Iran. *Mycopatholol.*, v. 133, p. 79-83, 1996.

SHING, K.; CHAHRABARTI, A.; GOPLAN, S. - Yeast colonisation & fungaemia in preterm neonates in a tertiary care centre. *Indian. J. Med. Res.*, v. 110, p. 169-73, nov. 1999. Resumo.

SIMPSON, A. J. G.; PENA, S. D. J. – Sequence-Specific Gene Signatures Produced by Low Stringency Single Specific Primer Polymerase Chain Reaction. In: TAYLOR, G. R. – *Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*. 1997. Cap. 13, p. 143-149.



- SINGHI, N.; BELEN, O.; LÉGER, M.; JOSEPH, M. C. – Cluster of *Trichosporon mucooides* in children associated with faulty bronchoscope *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 22, p. 609-12, 2003.
- SOBEL, J. D.; HASEGAWA, A.; DEBERNARDIS, F.; ADRIANI, D.; PELLEGRINI, G.; CASSONE, A.; FIDEL, P. L.; HAIDARIS, C. G.; GICLIOTTI, F.; HARMSEN, A. G.; FUJITA, S.; YAMAMOTO, K.; MAKIMURA, K.; SHIBUYA, K.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. – Selected animal models: vaginal candidosis, *Pneumocystis* pneumonia, dermatophytosis and trichosporonosis. *Med. Mycol.*, v. 36, s. 1, p. 129-136, 1998.
- SUGITA, T.; MAKIMURA, K.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H.; SHINODA, T. - Partial Sequences of Large Subunit Ribosomal DNA of a New Yeast Species, *Trichosporon domesticum* and Related Species. *Microbiol. Immunol.*, v. 41, n. 7, p. 571-73, 1997.
- SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T.; KUME, H. - Taxonomic Position of Deep-Seated, Mucosa-Associated, and Superficial Isolates of *Trichosporon cutaneum* from Trichosporonosis Patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, n. 5, p. 1368-70, may. 1995.
- SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. - Rapid Detection of Species of the Opportunistic Yeast *Trichosporon* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 5, p. 1458-60, may. 1998a.
- SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T.- Identification of *Trichosporon asahii* by PCR based sequences of the internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 9, p. 2742-4, sept. 1998b.
- SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; IKEDA, R.; NAKASE, T.; SHINODA, T. – Phylogenetic and Taxonomic Heterogeneity of *Cryptococcus humicolus* by Analyses of the Sequences of the Internal Transcribed Spacer Regions and

- 18S rDNA, and the Phylogenetic Relationship of *C. humicolus*, *C. curvatus*, and the Genus *Trichosporon*. *Microbio. Immunol.*, v. 44, n. 6, p. 455-61, 2000.
- SUGITA, T.; ICHIKAWA, T.; MATSUKURA, M.; SUEDA, M.; TAKASHIMA, M.; IKEDA, R.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. – Genetic Diversity and Biochemical Characteristics of *Trichosporon asahii* Isolated from Clinical Specimens, Houses of Patients with Summer-Type-Hypersensitivity Pneumonitis, and Environmental Materials. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 7, p. 2405-2411, jul. 2001a.
- SUGITA, T.; NAKAGIMA, M.; IKEDA, R.; NIKI, Y.; MATSUSHIMA, T.; SHINODA, T. – A Nested PCR Assay to Detect DNA in sera for the Diagnosis of Deep-Seated Trichosporonosis. *Microbio. Immunol.*, v. 45, n. 2, p. 143-48, 2001b.
- SUGITA, T.; NAKAGIMA, M.; IKEDA, R.; MATSUSHIMA, T.; SHINODA, T. – Sequence Analyses of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 5, p. 1826-30, may. 2002.
- UZUN, O.; ARIKAN, S.; KOCAGÖZ, S.; SANCAK, B.; UNAL, S. – Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University Hospital and effect of time of reading. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 38, p. 0101-107, 2000.
- VARTIVARIAN, S. E. - Virulence Properties and Nonimmune Pathogenetic Mechanisms of Fungi. *Clin. Infect. Dis.*, v. 14, s. 1, p. 30-6, 1992.
- VAN VAERENBERGH, B.; GROOTAERT, B.; MOENS, W. – Validation of a Method for the Preparation of Fungal Genomic DNA for Polymerase Chain Reaction (PCR) and Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). *J. Mycol.*, v. 5, p. 133-39, 1995.

- YANG, R.; AO, J.; WANG, W.; SONG, K.; LI, R.; WANG, D. – Disseminated trichosporonosis in China. *Mycoses*, v. 46, p. 519-523, 2003.
- WALSH, T. & PIZZO, P. A. - A Classification for Hospital-Acquired Fungal Infections and Mycoses Arising from Endogenous Flora or Reactivation. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 42, p. 517-45, 1988.
- WANG, H. Y.; LIN, J. L. – *Trichosporon beigelli* in a patient with hamodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v. 14, n. 8, p. 2017-8, aug. 1999. Resumo.
- WEN, L.; MIAO, Z. W.; QING, W. D. - Chemical modification of xylanase from *Trichosporon cutaneum* shows the presence of carboxyl groups and cysteine residues essential for enzyme activity. *J. Protein. Chem.*, v. 18, n. 6, p. 677-86, aug. 1999. Resumo.
- WILLIAMS, A . G.; KUBELIK, A . R.; LIVAK, K. J.; RAFASALKI, J. A .; TINGEY, S. V. – DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are useful as Genetic Markers. *Nucleic. Acids. Research.*, v. 18, p. 6531-35, 1990.
- WOLF, D. G.; HACHAM, M.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G.; SHAPIRO, M.; BLOCK, C.; SALKIN, I. F.; POLACHECK, I. – Multidrug-Resistant *Trichosporon asahii* Infection of Nongranulocytopenic Patients in Three Intensive Care Units. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 12, p. 4420-25, dec. 2001.

### Meios e reagentes utilizados

#### 1. Meios para isolamento das leveduras

##### 1.1. Solução Salina 0,85% esterilizada

|                      |         |
|----------------------|---------|
| NaCl .....           | 0,85g   |
| Água destilada ..... | 100,0mL |

Em um balão volumétrico de 100mL, foi adicionado o cloreto de sódio à água destilada, agitado até completa dissolução, completado o volume para 100mL, distribuído 2mL em cada tubo de ensaio que foi vedado com algodão hidrófobo e autoclavado à 121°C por 15 minutos.

##### 1.2. Ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol.

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Peptona.....        | 10,0g  |
| Dextrose.....       | 20,0g  |
| Cloranfenicol.....  | 0,30g  |
| Agar.....           | 15,0g  |
| Água destilada..... | 1000mL |

Em balão de 2000mL, os componentes sólidos foram adicionados à água destilada e aquecidos até completa dissolução, juntando-se depois o cloranfenicol. Após homogeneização, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri estéreis para cultivo das amostras. Para armazenamento das leveduras, foi distribuído em tubos de ensaio, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e deixado solidificar em posição inclinada.

#### 2. Meio para a manutenção das leveduras

##### 2.1. Caldo de cultura YEPD

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Extrato de levedura..... | 5,0g  |
| Dextrose .....           | 10,0g |
| Bactopeptona.....        | 10,0g |

Água destilada.....500,0mL

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada, distribuídos em tubos de ensaio e autoclavados à 121°C por 15 minutos.

### **3. Meios para identificação**

#### **3.1. Ágar-Extrato de Malte**

Extrato de Malte.....20,0g

Ágar .....20,0g

Glicose.....15,0 g

Peptona.....1,0g

Água destilada.....1.000,0mL

Em balão de 2000mL, os componentes sólidos foram adicionados à água destilada e aquecidos até completa dissolução, juntando-se depois o cloranfenicol. Após homogeneização, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri para cultivo das amostras.

#### **3.2. Meio para prova de fermentação de carboidratos (Zimograma)**

Peptona.....2,5g

Extrato de levedura.....2,5g

Água destilada.....1000mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Para 1000mL do meio basal foram adicionados, separadamente, 3g de glicose. Foram distribuídos 5mL do meio, em tubos de ensaio rosqueados frouxamente, contendo tubos de Durham invertidos, e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a autoclavação as tampas de rosca dos tubos vedaram os mesmos firmemente. Foram mantidos sob refrigeração entre 4 e 8°C.

#### **3.3. Meio para prova de assimilação de fontes de carbono (Auxanograma)**

Sulfato de amônia .....5,0g

Fosfato monobásico de potássio.....1,0g

Sulfato de magnésio heptahidratado.....0,5g

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Ágar.....           | 20,0g  |
| Água destilada..... | 1000mL |

O ágar foi adicionado a aproximadamente 800mL de água destilada e a mistura aquecida até completa dissolução. A seguir, foram adicionados os demais componentes, previamente dissolvidos na água restante. Após homogeneização, volumes de 18mL do meio foram distribuídos em tubos, e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

### 3.4. Meio para prova de assimilação de fontes de nitrogênio (Auxanograma)

|   |        |
|---|--------|
| Dextrose .....                          | 20,0g  |
| Fosfato monobásico de potássio.....     | 1,0g   |
| Sulfato de magnésio heptahidratado..... | 0,5g   |
| Ágar .....                              | 20,0g  |
| Água destilada.....                     | 1000mL |

O ágar foi adicionado a aproximadamente 800mL de água destilada e a mistura aquecida até completa dissolução. A seguir, foram adicionados os demais componentes, previamente dissolvidos na água restante. Após homogeneização, volumes de 18mL do meio foram distribuídos em tubos, e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

### 3.5. Agar Uréia de Christensen (Christensen, 1946)

#### Solução A:

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| Dextrose .....                        | 1,0g  |
| Peptona.....                          | 1,0g  |
| Cloreto de sódio.....                 | 5,0g  |
| Fosfato de potássio diidrogenado..... | 2,0g  |
| Ágar.....                             | 15,0g |
| Púrpura de bromocresol.....           | 24mg  |
| Água destilada.....                   | 900mL |

Dissolvidos os reagentes, o pH foi calibrado para 6,8 e em seguida a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

**Solução B:**

Uréia .....20,0g  
Água destilada.....100 mL

Após a dissolução da uréia, o pH foi calibrado para 6,8 e a solução filtrada em filtro “Millipore”. Ao atingir a temperatura entre 50-55°C, a solução A teve a solução B vertida sobre si, e após a homogeneização de ambas as soluções, o meio foi distribuído assepticamente (4mL) em tubos de ensaio e posteriormente inclinados para solidificação. Em seguida foram armazenados sob refrigeração.

**4. Meio para o teste de susceptibilidade****4.1. RPMI** (American Biorganic, Niagara Falls, N.Y.).

O RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e vedado com 34,53g de MOPS, foi adquirido comercialmente sob a forma de pó e preparado em água destilada esterilizada, na concentração de 45,4g/L. Vinte (20) g/L de glicose foram adicionadas ao meio. Após a calibração do pH a 7,0, o meio foi esterilizado por filtração, em filtro biológico (MILLIPORE Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, S.P.) de 0,22 micrômetro, conservado em refrigerador a 4°C e utilizado até três semanas após seu preparo.

**4.6.4.2. Agar RPMI** (American Biorganic, Niagara Falls, N.Y.).**Solução A:**

RPMI .....22,7g  
Dextrose ..... 10,0g  
MOPS..... 17,265g  
Água destilada.....250mL

Após a calibração do pH a 7,0, o meio foi esterilizado por filtração, em filtro biológico (MILLIPORE Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, S.P.) de 0,22 micrômetro.

**Solução B:**

Ágar.....10,0g  
Água destilada.....250,0mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e autoclavados à 121°C por 15 minutos.

Após esperar a solução B diminuir a temperatura foi vertida sobre a solução A rapidamente, homogeneizando vigorosamente. O meio foi distribuído com rapidez em placas de Petri, e após solidificação, mantido sob refrigeração.

## **5. Soluções e meios utilizados para “randomly amplified polymorphic DNA”**

### **5.1. TE de baixa molaridade**

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| EDTA 0,5M pH 7,5..... | 1,0mL   |
| TRIS 1M pH 7,5.....   | 5,0mL   |
| Água destilada.....   | 500,0mL |

Foram homogeneizados os componentes da fórmula e armazenados à temperatura ambiente.

### **5.2. Tampão TE**

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Tris - HCl 2M pH 7,4..... | 0,5mL   |
| EDTA 0,5M pH 8,0.....     | 20,0µL  |
| Água destilada.....       | 99,48mL |

A solução foi autoclavada e estocada à temperatura ambiente.

### **5.3. Tampão TBE estoque (5 vezes concentrado)**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Trizma base.....      | 54,0g  |
| Ácido Bórico.....     | 27,5g  |
| EDTA 0,5M pH 8,0..... | 10,0mL |
| Água destilada.....   | 1000mL |

Foram dissolvidos o trizma base e o ácido bórico em água destilada e adicionado o EDTA. Foi estocado à temperatura ambiente.

### **5.4. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% (w/v)**

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| SDS.....                  | 100,0g |
| Água destilada q.s.p..... | 1000mL |



Foram dissolvidas 100g de SDS em 800mL de água, aquecendo-se a solução à 50 ou 68°C. O pH foi ajustado para 7,0 com HCl concentrado e o volume final completado para 1000mL. Foi estocado à temperatura ambiente.

#### 5.5. NaOH 10M

NaOH.....40,0g

Água destilada q.s.p.....100,0mL

O NaOH foi dissolvido em água sob agitação e estocado em frasco plástico à temperatura ambiente.

#### 5.6. Acetato de sódio 3M

Acetato de sódio.3H<sub>2</sub>O.....40,8g

Água destilada q.s.p.....100,0mL

O acetato de sódio foi dissolvido em 80mL de água e ajustado o pH para 4,5 com ácido acético glacial. Foi adicionada água para um volume final de 100mL, e a suspensão foi autoclavada e estocada à temperatura ambiente.

#### 5.7. Solução de dNTP mix (1,25mM estoque)

dATP (PHARMACIA) .....6,3µL

dCTP (PHARMACIA).....6,3µL

dGTP (PHARMACIA).....6,3µL

dTTP (PHARMACIA).....6,3µL

Água destilada.....475,0µL

Os nucleotídeos foram pipetados na ordem descrita, homogeneizados gentilmente, e a solução mantida à -20°C.

#### 5.8. Buffer (Tampão) de corrida

Azul de bromofenol.....0,06g

Xilenocianol.....0,06g

Ficol 15% (TYPE 400).....3,75g

Água destilada.....25,0 mL

TBE 5X.....25,0mL

Após homogeneização foi estocado à  $-20^{\circ}\text{C}$  e a solução de uso mantida sob  $4-8^{\circ}\text{C}$ .

### 5.9. Tris - HCl 2M

Trizma base .....242,2g

Água destilada q.s.p.....1000mL

O trizma base foi dissolvido em 700 mL de água destilada e ajustado o pH para 7,4 adicionando-se  $\pm 140\text{mL}$  de HCl concentrado. O volume foi completado para 1000mL com água destilada e autoclavado. Foi estocado à temperatura ambiente.

### 5.10. Tris - HCl 1M

Trizma base.....121,1g

Água destilada q.s.p.....1000mL

O trizma base foi dissolvido em 800mL de água destilada, a solução esfriada à temperatura ambiente e aferido o pH para 7,4 adicionando HCl. O volume foi completado para 1000mL e esterilizado em autoclave. Foi estocado à temperatura ambiente.

### 5.11. $\text{CaCl}_2$ 2,5M

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....13,5g

Água destilada.....20,0mL

A solução foi esterilizada em filtro 0,22 micrômetros, estocada em alíquotas de 1mL em tubos de microcentrifugação à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.12. $\text{CaCl}_2$ 1M

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....54,0g

Água destilada.....200,0mL

A solução foi esterilizada em filtro 0,22 micrômetros, estocada em alíquotas de 1mL em tubos de microcentrifugação à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.13. EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA.2H<sub>2</sub>O.....186,1g

Água destilada q.s.p.....1000mL

O EDTA foi adicionado em 800mL, agitado vigorosamente em agitador magnético, o pH ajustado para 8,0 com NaOH (~ 20g de pastilha de NaOH). Dispensado em alíquotas e esterilizado por autoclavação.

### 5.14. Brometo de Etídium 10mg/mL

Brometo de etídium.....0,2g

Água destilada.....19,8mL

Estocado entre 4-8°C e em frasco escuro.

### 5.15. Tampão citrato - sorbitol

Citrato de sódio 0,1 M.....14,55 g

Sorbitol 0,1 M.....91,1 g

Água destilada q.s.p.....500,0 mL

Esterilizado por autoclavação e mantido entre 4-8°C .

### 5.16. Preparo da Glucanase (Zimoliase) (Novo Nordisk do Brasil, R.S).

Glucanase 2.000U/1mL .....149,0 mg

Tampão citrato-sorbitol.....1.000µL

Preparada no momento do uso.

### 5.17. Tampão protoplasto (p/ 1mL)

β-mercaptoetanol .....10,0µL

Tris - HCl 1M pH 7,4.....100,0µL

EDTA 10mM.....20,0µL

Glucanase 200U/100µL .....100,0µL

Água bidestilada estéril.....770,0µL

O tampão foi preparado na hora do uso.

### 5.18. Tampão de lise

NaOH 10N.....20,0 $\mu$ L

SDS 10%.....100,0 $\mu$ L

Água bidestilada estéril.....880,0 $\mu$ L

O tampão foi preparado na hora do uso.

## 6. Equipamentos empregados nos experimentos

| <b>Equipamento</b>     | <b>Fabricante</b> |
|------------------------|-------------------|
| Estufa                 | Fanem             |
| Termocilcador          | M.J. Research     |
| Centrífuga refrigerada | Eppendorff        |
| Centrífuga             | Bio Research      |
| Cuba                   | Biorad            |

## ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY PROFILE OF *TRICHOSPORON* ISOLATES: CORRELATION BETWEEN CLSI AND ETEST METHODOLOGIES

Raquel M.L. Lemes<sup>1</sup>; Juliana P. Lyon<sup>2\*</sup>; Leonardo M. Moreira<sup>3</sup>; Maria Aparecida de Resende<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>2</sup>Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, MG, Brasil.

Submitted: April 08, 2009; Returned to authors for corrections: December 03, 2009; Approved: February 18, 2010.

### ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the antifungal susceptibility profile of *Trichosporon* species isolated from different sources employing the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) method and E-test method. Thirty-four isolates of *Trichosporon* spp. and six CBS reference samples were tested for their susceptibility to Amphotericin B, 5-flucytosine, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole and Terbinafine. All species showed high Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for Itraconazole and susceptibility to Fluconazole. The comparison among the results obtained by the CLSI method and E-test revealed larger discrepancies among 5-flucytosine and Itraconazole. The present work provides epidemiological data that could influence therapeutic choices. Furthermore, the comparison between different methodologies could help to analyze results obtained by different laboratories.

**Key Words:** *Trichosporon* spp., antifungal drugs, CLSI, E-test

### INTRODUCTION

Systemic fungal infections occur with increasing frequency in hospitalized patients. Although *Candida* species account for the majority of fungal systemic diseases, the number of yeasts that can cause infection continues to increase. In recent years, several reports of trichosporonosis have appeared (3, 6, 11, 16) *Trichosporon* infections are associated with a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from superficial cutaneous involvement in immunocompetent individuals to severe systemic disease in immunocompromised patients (19).

Trichosporonosis is mainly caused by six species: *T.*

*asahii* and *T. mucoides* are causative agents of deep-seated infection, *T. cutaneum* and *T. asteroides* cause superficial infections, and *T. ovoides* and *T. inkin* are involved in white piedra of the head and genital area, respectively (4, 17). Kustimur *et al.* (6) reported the first case of disseminated infection due to *T. asteroides* in an intensive care patient. Carvalho *et al.* (2) reported a systemic infection involving *T. cutaneum* in a child with Wilm's tumour and Neves *et al.* (9) isolated *T. pulullans* from the oral cavity of an HIV positive patient.

The increase in the incidence and morbidity of fungal infections has caused interest in the development of new appropriate therapeutics (13). The CLSI method (8) for

\*Corresponding Author. Mailing address: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos-SP, Brasil. Av. Shishima Hifumi, 2911 Zip Code: 12244-000 – Bairro Urbanova, São José dos Campos – SP.; Tel.: 55-12-3947-1168.; E-mail: [julianalyon@univap.br](mailto:julianalyon@univap.br)

antifungal susceptibility testing includes the genera *Candida* and *Cryptococcus*, but not *Trichosporon* spp. According to Arikan and Haşçelik (1), it is unknown whether there is any species-related variation in the antifungal susceptibility profile of *Trichosporon* isolates. Additionally, the concordance between the methodologies used to delineate antifungal susceptibility profiles has not been extensively accessed for *Trichosporon* spp.

The present study was undertaken to determine the in vitro antifungal susceptibility profile of different species of *Trichosporon* isolates by using the CLSI reference method and E-test. The epidemiological data obtained could be helpful in the development of therapeutic strategies. Besides, the comparison between different methodologies is important to analyze results obtained by different laboratories.

## MATERIAL AND METHODS

### Isolates

Thirty-four isolates belonging to the collection of the laboratory of Mycology of the department of Microbiology of the Federal University of Minas Gerais were tested. The isolates were obtained from different sources: urine (12), oropharynx (8), blood (4), nail (3) skin (3), hair (1), bronchoalveolar lavage (1), fingers (1) and environment (1). The isolates were previously identified using morphological, physiological and biochemical proofs according with Kurtzman and Fell (4). The tests employed for identification were macroscopic appearance of the giant colony, microscopic features, susceptibility to cycloheximide, growth temperature, diazonium Blue color reaction, urease production and carbohydrate and nitrogen assimilation profiles. Six CBS reference samples (CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Baarn, The Netherlands) were included in susceptibility testing: *T. asahii* (CBS – 2479), *T. coremiiforme* (CBS -2482), *T. asteroides* (CBS - 3481), *T. inkin* (CBS - 5585), *T. mucoides* (CBS - 7625) and *T. ovoides* (CBS – 7556). All the strains were maintained at 4° C on Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Difco, Detroit, MI, USA) with 300 µg/ml of chloramphenicol and BHI broth (Brain

Heart Infusion, Difco), until susceptibility tests were carried out. Transfers were done at 3-month intervals. The isolates were stored for three months.

### Antifungal susceptibility testing

CLSI method- Susceptibility testing was performed according to the M27-A2 document of the CLSI (8). Amphotericin B (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 5-flucytosine (Hoffman La Roche, Bale, Switzerland), Fluconazole (Pfizer São Paulo, Brazil), Itraconazole (Janssen Pharmaceutica, São Paulo, Brazil), Voriconazole (Pfizer, São Paulo, Brazil), and Terbinafine (Novartis Biocências S.A., São Paulo, Brazil) were obtained as reagent grade powders from their respective manufacturers. Dilutions were made in RPMI 1640 medium (Sigma, St Louis, Mo, USA) buffered to pH 7 with 0,165M (3[N-morpholino] propanesulfonic acid) buffer (Sigma). The inoculum was prepared in a concentration of  $1-5 \times 10^6$  cells/ml. The final concentration of the inoculums was  $1.0 \times 10^3$  to  $1.5 \times 10^3$  cell/ml. The final concentration of the antifungal agents was 0.03 to 16 µg/ml for Itraconazole, 0.12 to 64.0 µg/ml for Amphotericin B, Voriconazole, Terbinafine, and Fluconazole and 0.25 to 128.0 g/ml for 5-flucytosin. Trays were incubated at 35°C and MIC (Minimum Inhibitory Concentration) endpoints were read after 48h of incubation. Drug free and yeast controls were included.

Following incubation, the MICs of Fluconazole, Terbinafine, Voriconazole and Itraconazole were read as the lowest concentration at which prominent decrease in turbidity relative to the growth control was observed (decrease of 80% in turbidity). For Amphotericin B and 5-flucytosine, MIC was considered as the complete inhibition of growth. Quality control was ensured by testing the CLSI recommended strain *C. parapsilosis* ATCC 22019. The isolate was considered to be susceptible if the MIC value was 2-8µg/ml for Fluconazole, ≤ 0,125µg/ml for Itraconazole, 8-16µg/ml for 5-flucytosine, and ≤1µg/ml for Amphotericin B, as suggested by Wolf *et al* (19) and ≤1µg/ml for Voriconazole, as suggested by Pfaller *et al* (10). The isolate was considered to be susceptible if the MIC value for Terbinafine was ≤ 1.4 µg/ml, as considered for

*Candida albicans* by Ryder *et al* (13).

#### E-test

All the samples were tested by E-test for susceptibility profile. The test was performed according to the manufacturer's instructions (AB Biodisk, Solna, Sweden). Briefly, the inoculum concentration was adjusted to a 0.5 McFarland standard for *Candida* species ( $1-5 \times 10^6$  cell/ml). Then, 0.5 ml of this suspension was inoculated onto plates containing RPMI 1640 agar (1.5%) with 2% glucose using a cotton swab. After a period of 15 minutes, the E-test strips

were applied. The antifungal drugs Amphotericin B, Itraconazole, Fluconazole and 5-flucytosine were tested. The plates were incubated at 35° C and read after 24 and 48 hours.

## RESULTS

MICs of Voriconazole, Terbinafine, Amphotericin B, 5 - flucytosine, Fluconazole and Itraconazole for six CBS *Trichosporon* spp. strains are represented in Table 1. Amphotericin B, 5 - flucytosine, Fluconazole and Itraconazole were tested by both, CLSI and E-test methods.

**Table 1.** Minimum inhibitory concentration (g/ml) for CBS (Centraalbureau Voor Schimmelcultures) strains obtained by CLSI and E-test methodologies

|                                   | AMB   | 5-FC  | FLU  | ITR  | TER  | VOR  |
|-----------------------------------|-------|-------|------|------|------|------|
| <i>T. asahii</i> (CBS 2479)       |       |       |      |      |      |      |
| CLSI                              | 0.25  | 2     | 32   | 2    | 0.03 | 0.5  |
| E-test                            | 0.25  | 8     | 32   | 1    | -    | -    |
| <i>T. asteroides</i> (CBS 3481)   |       |       |      |      |      |      |
| CLSI                              | 1     | 32    | 0.5  | 0,5  | 1    | 0.5  |
| E-test                            | 0.125 | 32    | 0.75 | 0.75 | -    | -    |
| <i>T. coremiiforme</i> (CBS 2482) |       |       |      |      |      |      |
| CLSI                              | 0.5   | 0.5   | 1    | 2    | 2    | 1    |
| E-test                            | 0.38  | 0.75  | 256  | 0.75 |      |      |
| <i>T. inkin</i> (CBS 5585)        |       |       |      |      |      |      |
| CLSI                              | 64    | 2     | 64   | 64   | 8    | 4    |
| E-test                            | 32    | 0.006 | 256  | 32   | -    | -    |
| <i>T. mucooides</i> (CBS 7625)    |       |       |      |      |      |      |
| CLSI                              | 0.12  | 64    | 0.5  | 2    | 0.25 | 0.25 |
| E-test                            | 0.38  | 32    | 8    | 0.75 | -    | -    |
| <i>T. ovoides</i> (CBS 7556)      |       |       |      |      |      |      |
| CLSI                              | 0.125 | 2     | 2    | 2    | 2    | 0.25 |
| E-test                            | 0.25  | 0.38  | 0.38 | 0.38 | -    | -    |

- = Test not performed

AMB= Amphotericin B; 5-FC= 5 flucytosine; FLU = Fluconazole; ITR = Itraconazole; TER= Terbinafine; VOR= Voriconazole.

Results shown in table 2 regarding MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> (MIC for 50 % and 90 % of the strains tested respectively) reveal that *T. mucooides* was susceptible to Amphotericin B (1/ 1µg/ ml), Terbinafine (0.5/ 1µg/ ml), and Voriconazole (0.25/ 0.5 µg/ml), while the other species were resistant to these drugs (8, 11, 16) All species showed resistance to Itraconazole and susceptibility

to Fluconazole, according to the parameters suggested by Wolf *et al* (16). *T. ovoides* showed susceptibility to Fluconazole and 5-flucytosine only.

The samples of *Trichosporon* spp. were submitted to comparison between the two methods (CLSI and E-test). Only one sample (*T. ovoides*) showed resistance to Amphotericin B

by the CLSI method (2 µg/ ml) and susceptibility to this drug by E-test (0,75 µg/ ml). When the samples were compared for 5-flucytosine, two (*T. mucoides*, MIC<sub>50/90</sub> > 250 / > 32 µg/ ml and *T. asahii*, MIC<sub>50/90</sub> 16/ >32 µg/ ml) showed resistance in

both methods. Regarding Itraconazole, two isolates showed susceptibility by the E-test and resistance by CLSI method. The parameters for resistance and susceptibility are those proposed by Wolf *et al* (16) and Pfaller *et al* (8).

**Table 2.** *In vitro* antifungal susceptibility profile of 34 isolates of *Trichosporon* spp

| Species (n)              | MIC range |           | MIC <sub>50</sub> (24/48h) | MIC <sub>90</sub> (24/48h) |
|--------------------------|-----------|-----------|----------------------------|----------------------------|
|                          | 24 hours  | 48 hours  |                            |                            |
| <i>T. asahii</i> (26)    |           |           |                            |                            |
| Amphotericin B           | 0.06 - 64 | 0.06 - 64 | 2/ 4                       | 64/ 64                     |
| 5-flucytosine            | 0.25 - 32 | 0.25 - 64 | 2/ 4                       | 8/ 16                      |
| Fluconazole              | 0.5 - 8   | 0.5 - 16  | 2/ 4                       | 8/ 8                       |
| Itraconazole             | 0.5 - 32  | 0.5 - 64  | 2/ 4                       | 8/ 16                      |
| Terbinafine              | 0.03 - 4  | 0.03 - 8  | 0.5/ 2                     | 4/ 8                       |
| Voriconazole             | 0.03 - 4  | 0.03 - 4  | 0.5/ 1                     | 1/ 2                       |
| <i>T. asteroides</i> (5) |           |           |                            |                            |
| Amphotericin B           | 0.5 - 2   | 1 - 4     | 0.5/ 2                     | 2/ 64                      |
| 5-flucytosine            | 0.25 - 64 | 4 - 64    | 2/ 8                       | 64/ 64                     |
| Fluconazole              | 0.5 - 2   | 1 - 8     | 1/ 2                       | 2/ 8                       |
| Itraconazole             | 2 - 4     | 2 - 16    | 2/ 8                       | 4/ 16                      |
| Terbinafine              | 0.25 - 4  | 2 - 8     | 1/ 4                       | 4/ 8                       |
| Voriconazole             | 0.062 - 1 | 0.5 - 2   | 0.5/ 1                     | 1/ 2                       |

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

MIC<sub>90</sub>: Minimum Inhibitory concentration for 90% of the isolates

MIC<sub>50</sub>: Minimum Inhibitory concentration for 50% of the isolates

*T. ovoides* and *T. mucoides* were not included in this table due to the small number of isolates tested

## DISCUSSION

The comparison of the susceptibility profile of CBS reference samples with the data available in the literature reveals that the results obtained for *T. asahii* (CBS 2479) in the present work were concordant with those obtained by Wolf *et al.* (19) for Amphotericin B and Fluconazole. When we compared the results obtained in the present work by the CLSI method of (2µg/ml), with those obtained by Ghého *et al.* (4), (0,019µg/ ml) the discrepancy among MICs obtained for Itraconazole against *T. mucoides* and *T. ovoides* reached 100 folds the dilution. The comparisons allowed the observation of the differences in MIC values obtained for different groups, even considering reference samples. These differences emphasize the importance of the standardized intra-laboratory conduct, since results obtained in our experiment were compatible with those obtained by Wolf *et al.* (19) that also

used a visual system of evaluation, while Guého *et al.* (4) used an automatic system.

The presented data reveal a profile of high resistance of the genus *Trichosporon* to Amphotericin B and Itraconazole, high susceptibility to Fluconazole and moderate resistance to 5-flucytosine. Rodriguez-Tudela *et al.* (12) reported that the majority of the *T. asahii*, *T. faecali* and *T. coremiiforme* exhibited resistance to Amphotericin B in vitro. Li *et al.* (7) reported resistance to Amphotericin B among *T. asahii*, *T. cutaneum* and *T. inkii* strains. Differently, Uzun *et al.* (18), analyzing the in vitro susceptibility of eight samples of *Trichosporon* spp. reported that those samples were susceptible to Amphotericin B, but susceptible to Fluconazole. Silva, *et al.*, (15) also evaluate the antifungal susceptibility profile of *T. asahii* clinical isolates. The isolates had reduced susceptibility *in vitro* to all drugs, showing 4-6 times higher MICs to itraconazole and 3-4 times to 5-flucytosine compared of MICs



breakpoint values. In this study, Fluconazole exhibited the best activity *in vitro* against the majority of the isolates (90%), with MIC of 16 g/ml and only one isolate with 32 g/ml. Three isolates have MIC value for Amphotericin B above 2 g/ml.

Variable susceptibility to Amphotericin B has been observed with samples of the genus *Trichosporon*, especially among isolates obtained from immunocompromised patients. This observation could result in a better conduct for antifungal therapy. On the other hand, Fluconazole was effective indicating that the azolic can be the valid option in the therapy of this infection, commonly difficult to treat.

Resistance to Itraconazole was observed in all of the *Trichosporon* species, as well as susceptibility to the Fluconazole. Only *T. mucoides* was susceptible to Amphotericin B, Terbinafine and Voriconazole, being the other species resistant to these drugs. The results obtained in this work with Voriconazole, when compared to those obtained by Uzun *et al.* (17) were surprisingly more than 30 times higher. On the other hand, Serena *et al.* (14) used a guinea pig model of systemic trichosporonosis to demonstrate a better efficacy of Voriconazole in comparison with Amphotericin B.

Regarding the comparison between the CLSI method and the E-test, the greater divergence from those reported in previous works were obtained for 5-flucytosine, while data obtained for Amphotericin B were considerably in agreement with other researchers. Although the number of samples analyzed is small, the correlation between the two methods for Amphotericin B is significant (1, 4, 19).

*Trichosporon* species has been increasingly involved in systemic infections and, despite this fact, there are relatively few studies about its antifungal susceptibility profile. Although these data do not correlate the susceptibility "in vitro/in vivo", the present work provides epidemiological data that could influence therapeutic choices. Furthermore, the comparison between different methodologies could help to analyze results obtained by different laboratories.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de

Pesquisa)

#### REFERENCES

1. Arıkan, S.; Hascelik, G. (2002). Comparison of NCCLS microdilution method and E-test in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43,107-111.
2. Carvalho, A.M.R.; Melo, L.R.B.; Moraes, V.L.; Neves, R.P. (2008). Invasive *Trichosporon Cutaneum* Infection In An Infant With Wilms' Tumor. *Braz. J. Microbiol.* 39, 59-60.
3. Gökahmetoglu, S.; Nedret Koc, A.; Günes, T.; Cetin, N. (2002). Case Reports. *Trichosporon mucoides* infection in three premature newborns. *Mycoses* 45, 123-125.
4. Guého, E.; Improvisi, L.; Hoog, G.S.; Dupont, B. (1994). *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses* 37, 3-10.
5. Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (1998). *The yeasts-A taxonomic study*. 4 ed. Elsevier.
6. Kustimur, S.; Kalkanci, A.; Caglar, K.; Disbay, M.; Aktas, F. (2002). Nosocomial fungemia due to *Trichosporon asteroides*: firstly described bloodstream infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43, 167-170.
7. Li, H.M.; Du, H.T.; Liu, W.; Wan, Z.; Li, R.Y. (2005). Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon* species. *Mycopathologia.* 160, 217-224.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
9. Neves, R.P.; Cavalcanti, M.A.Q.; Chaves, G.M.; Magalhaes, O.M.C. (2002). *Trichosporon Pullulans* (Lidner) Diddens & Lodder Isolated From The Oral Cavity Of Aids Patient. *Braz. J. Microbiol.* 33, 241-242.
10. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J.; Messer, S.A.; Boyken, S.; Hollis, R.J.; Jones, R.N. (2003). *In vitro* activities of Voriconazole, Pozaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J. Clin. Microbiol.* 1, 78-83.
11. Rodrigues, G.S.; Faria, R.R.; Guazzelli, L.S.; Oliveira, F.M.; Severo, L.C. (2006). Nosocomial infection due to *Trichosporon asahii*: clinical revision of 22 cases. *Rev. Iberoam. Micol.* 23, 85-89.
12. Rodriguez-Tudela, J.L.; Diaz-Guerra, T.M.; Mellado, E.; Cano, V.; Tapia, C.; Perkins, A.; Gomez-Lopez, A.; Rodero, L.; Cuenca-Estrella, M. (2005). Susceptibility Patterns and Molecular Identification of *Trichosporon* Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4026-4034.
13. Ryder, N.S. (1999). Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. *Mycoses* 42, 115-119.
14. Serena, C.; Gilgado, F.; Marine, M.; Pastor, F.J.; Guarro, J. (2006). Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of invasive trichosporonosis. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 50, 2240-2243.
15. Silva, R.B.O.; Fusco-Almeida, A.M.; Matsumoto, M.T.; Baeza, L.C.; Benaducci, T.; Mendes-Gianinni, M.J.S. (2008). Genetic Diversity And

- Antifungal Susceptibility Testing Of *Trichosporon Asahii* Isolated Of Intensive Care Units Patients. *Braz. J. Microbiol.* 39, 585-592.
16. Sood, S.; Pathak, D.; Sharma, R.; Rishi, S. (2006). Urinary tract infection by *Trichosporon asahii*. *Indian. J. Med. Microbiol.* 24, 294-296.
  17. Sugita, T.; Nishikawa, A.; Shinoda, T.; Kume, H. (1995). Taxonomic position of deep-seated, mucosa associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from trichosporonosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1368-1370.
  18. Uzun, O.; Arıkan, S.; Kocagoz, S.; Sancak, B.; Unal, S. (2000). Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University Hospital and effect of time of reading. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 38,101-107.
  19. Wolf, D.G.; Hacham, M.; Theelen, B.; Boekhout, T.; Scorzetti, G.; Shapiro, M.; Block, C.; Salkin, I.F.; Polacheck, I. (2001). Multidrug-Resistant *Trichosporon asahii* Infection of Nongranulocytopenic Patients in Three Intensive Care Units. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4420-25.