

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**ANÁLISE FENOTÍPICA, GENOTÍPICA, PROTEÔMICA E FATORES DE  
VIRULÊNCIA DE CEPAS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon*: ISOLADOS  
HUMANOS, ANIMAIS E AMBIENTAIS**

**ALUNA: BRUNA ROSSINI LARA**  
**ORIENTADORA: LUCIANA DA SILVA RUIZ MENEZES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do  
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração  
Biologia de Parasitas e Microrganismos.

**BOTUCATU – SP**

**2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lara, Bruna Rossini.

Análise fenotípica, genotípica, proteômica e fatores de virulência de cepas de leveduras do gênero *Trichosporon* : isolados humanos, animais e ambientais / Bruna Rossini Lara.  
- Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luciana da Silva Ruiz Menezes

Capes: 20100000

1. Fatores de virulência. 2. *Trichosporon*. 3. Leveduras (Fungos). 4. Suscetibilidade a doenças.

Palavras-chave: Fatores de virulência; Identificação fúngica; Susceptibilidade antifúngica; *Trichosporon* spp.

*“Se a provação te busca,  
Não desanimes. Segue.  
Ninguém te estrague o dom  
De renovar a vida.  
Todos vivem na Terra  
Com lições e problemas.  
Pelas próprias tendências,  
Saberás porque sofres.  
Nossa luta maior,  
Será sempre em nós mesmos.  
Segue e confia em Deus  
Deus te orientará.”*

*Emmanuel  
Chico Xavier*

## DEDICATÓRIA

Primeiramente à **Deus**, que me guiou até este momento sem nunca me abandonar, mesmo quando por algum motivo eu fraquejei e questioneei minha fé.

Aos meus incríveis e amados pais **José Antonio** e **Salete** e a minha incomparável irmã **Mônica** por serem minha base, meus maiores apoiadores desde o dia em que eu nasci, por acreditarem em mim, no meu potencial e nas minhas ideias, por todo suporte, colo, carinho e proteção em todos esses anos e por todos os próximos que virão. Vocês são meus exemplos de honestidade e força e eu tenho muito orgulho de ser parte dessa família, todas as minhas conquistas eu devo a vocês, obrigada por nunca soltarem minha mão, sempre serei eternamente grata por tudo.

Ao meu grande amor, meu noivo **Lucas**, que com toda sua paciência, calma e amor me ajuda nos momentos de desespero e me alegra com todos os planos que temos para o nosso futuro, me encorajando a nunca desistir, nosso caminho está só começando e eu tenho muita alegria em estar trilhando uma vida ao seu lado. Sem nunca esquecer, é claro, dos nossos filhos de quatro patas, **Nala** e **Apollo**.

Aos meus queridos sogros **Silvana** e **Leonildo**, que sempre me acolheram como uma filha e são exemplos a serem seguidos por nunca desistirem, por mais difícil que a batalha pareça ser. À minha cunhada **Aline**, que é como uma irmã postiça e entendeu todos os momentos em que eu desapareci por estar escrevendo este trabalho.

Ao meu **Vô Zé** (*in memoriam*) que infelizmente não teve tempo de me ver crescer e me tornar aquilo que eu combinei com ele que me tornaria. Eu amaria ter a chance de ficar horas discutindo este trabalho com ele.

À minha **Vó Francisca** (*in memoriam*) que ao invés de me fazer prometer o que fazer quando crescer me ensinou alguns palavrões escondido dos meus pais quando criança e poderia não entender nada do assunto deste trabalho mais iria me ouvir falar por puro e simples amor.

Por fim, gostaria de fazer uma dedicatória especial à minha **Tia Ana**, por ser uma mulher forte e guerreira e colocá-la como uma representante de todos aqueles que assim como ela perderam alguém que amam neste triste momento de pandemia em que estamos passando, tenham força e fé em Deus e na Ciência, pois eles podem salvar vidas.

**VACINAS SALVAM VIDAS!!!!**

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Luciana da Silva Ruiz**, que me acolheu em seu laboratório quando eu estava no início do segundo ano da graduação e apenas tinha visto duas aulas de Microbiologia. Já se passaram 6 anos e eu sigo no que agora eu chamo de “*nosso laboratório*”. Este é o reflexo da liberdade que você me deu neste tempo em que estamos caminhando juntas. Você me ofereceu liberdade, mas com rédeas curtas, já que com seu jeito “*mãezona*” nunca me deixou completamente sozinha, sempre está por perto, disponível e acessível para me socorrer e me direcionar. Você me guiou para onde estamos hoje, aqui defendendo a “*nostra dissertação*” e nos preparando para darmos início a uma nova fase do doutorado, então eu sou muito grata por todos esses anos de ensinamento e por ter a chance de ter mais alguns pela frente ainda. Eu agradeço pelos puxões de orelha quando eu desanimei, por me mostrar que as coisas sempre tendem a melhorar e por sempre confiar no meu potencial, mesmo quando eu duvidei. Você sabe o quanto eu sou grata a você por todas as oportunidades e o quanto você faz parte da minha vida não só profissional como pessoal.

Ao meu companheiro de laboratório, **Bruno Braidotti de Camargo**, que entrou para ser estagiário de treinamento técnico e se tornou meu braço direito e um grande amigo para a vida. O meu muitíssimo obrigada por todas as vezes que você ficou acordado comigo até tarde conversando sobre como fazer algumas contas, alguns protocolos, tentando desvendar as técnicas e aplicar tudo, me explicando com a maior paciência quando eu falava que não entendia nada do seu “*linguajar farmacêutico*”. Obrigada por trabalhar comigo em feriados e fora do seu horário quando a pandemia atrasou tudo, por me ajudar em tudo que eu pedia e até no que eu não pedia e por estar sempre disposto, me ouvindo sem parar. Tenho certeza de que seu futuro profissional será brilhante onde quer que você escolha traçá-lo, você tem potencial de sobra e eu tenho muito orgulho de ter participado da sua trajetória. Você vai longe, confie no seu potencial.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto Adolfo Lutz – CLR II, Bauru, que me recebe como aluna desde a graduação até os dias de hoje e todos os funcionários que sempre foram tão gentis e solícitos comigo, em especial a Magali e a Kelly do setor de meio de cultura, por todo ensinamento e aprendizado que me dedicaram em todos esses anos e pela pronta assistência em que sempre me atenderam.

Ao Dr. Hans Garcia Garces e a toda equipe do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Unesp, Botucatu, por sempre estarem dispostos e prontos para ajudarem em tudo que precisei.

Aos Profs. Drs. Eduardo Bagagli e Sandra de Moraes Gimenes Bosco por me receberem de braços abertos, sempre nos disponibilizando espaço em seus laboratórios e nos auxiliando em tudo que precisávamos.

À Dra. Amanda Latercia Tranches Dias e Dra. Naiara Chaves Silva por todo auxílio e suporte em nos ajudar, sempre disposta e pronta para nos atender da melhor forma possível.

À Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes por nos ajudar e se prontificar em esclarecer nossas dúvidas todas as vezes que precisamos.

À Dra. Claudete Rodrigues de Paula, Dr. Hans Garcia Garces, Dr. Diniz Pereira Leite Junior e Dra. Viviane Mazo Fávero Gimenes por cederem gentilmente amostras para a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo - Instituto de Medicina Tropical, São Paulo-SP e ao Instituto Adolfo Lutz Central, São Paulo-SP por nos ajudarem na realização de técnicas essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Capes e a FAPESP, pelo apoio financeiro concedido para realização desta pesquisa (Processo Nº 2019/08419-7).



*“Agora, pode parecer que você não consegue fazer qualquer coisa, mas é só porque você não é uma árvore ainda. Você só precisa se dar mais tempo, você ainda é uma semente.”*

*Flik (Vida de inseto)*

## RESUMO

*Trichosporon* spp. são amplamente distribuídos na natureza, compreendendo inúmeras espécies que habitam diferentes nichos ecológicos, podendo ser encontrados em água, solo e superfície corpórea de animais. Em humanos, este gênero fúngico ocasionalmente encontra-se como membro da microbiota gastrointestinal e cavidade oral e, transitoriamente, pode colonizar o trato respiratório e pele. Este microrganismo tem sido classicamente associado a infecções superficiais, no entanto, nas últimas décadas, também se apresenta relacionado às infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos, comportando-se como agente oportunista. Visando aumentar os conhecimentos acerca deste agente patogênico e auxiliar na compreensão sobre os aspectos que envolvem diagnóstico precoce e terapia adequada este trabalho teve como objetivos: re-identificar fenotipicamente, genotipicamente e por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) (MALDI-TOF MS) leveduras do gênero *Trichosporon* de origem humana, animal e ambiental mantidas em micoteca; determinar e comparar os fatores relacionados a virulência: secreção das enzimas fosfolipase e proteinase, bem como a produção de biofilme; avaliar os padrões de susceptibilidade dos biofilmes a determinados antifúngicos; avaliar os padrões de susceptibilidade dos isolados frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, anfotericina-B, voriconazol e caspofungina, comparando as técnicas de microdiluição em caldo e Etest. O nível de concordância entre a metodologia fenotípica tradicional e a técnica molecular, na identificação das 59 amostras de *Trichosporon*, foi de 54,2%. A concordância na identificação entre o MALDI-TOF MS e a técnica molecular foi de 67,8%. Nenhum isolado ambiental foi passível de identificação por meio do MALDI-TOF MS e 100% destes isolados não foram concordantes na identificação de sequenciamento da região IGS com a caracterização fenotípica. Do total de amostras estudadas, a espécie que apresentou maior frequência foi *T. asahii* (52,6% - 31/59), seguida por *T. debeurmannianum* (18,6% - 11/59), *T. inkin* (13,5% - 08/59) e *T. dermatis* (5,1% - 03/59). Do total de isolados, 89,8% e 96,6% não apresentaram atividade para proteinase e fosfolipase, respectivamente. A habilidade de formar biofilme sob a superfície de placas de poliestireno foi observada em todos os isolados, sendo 54,3% das amostras consideradas como fortemente produtoras. Em relação a susceptibilidade antifúngica, voriconazol apresentou os menores valores de CIM para as amostras humanas e animais em ambas as metodologias estudadas e para as amostras ambientais na metodologia de microdiluição em caldo. Quando as amostras ambientais foram testadas frente ao método comercial Etest, foi observado valores menos elevados de CIM frente ao antifúngico anfotericina B. A caspofungina e o fluconazol foram os antifúngicos com os maiores CIMs. Quando comparadas as duas técnicas de susceptibilidade antifúngica, o método Etest apresentou valores de CIMs mais elevados em relação ao método de microdiluição. Quanto a sensibilidade dos biofilmes, todas as espécies apresentaram valores elevados de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> frente aos antifúngicos testados, entretanto algumas espécies apresentaram menores valores de CIM. *T. coremiiforme* apresentou valores menores de CIM para fluconazol, *T. montevidense* para itraconazol, *T. insectorum* para voriconazol e *T. veenhuisii* para fluconazol e voriconazol. Foi realizada análise genotípica de 31 isolados de *T. asahii*, 83,88% foram identificados como genótipo 1, genótipos 4 e 7 também foram identificados com 12,90% e 3,22%, respectivamente. Quanto a localização geográfica, foram isoladas em São Paulo-SP e Cuiabá-MT amostras de *T. asahii* de genótipos 1 e 4 e na cidade de Bauru-SP foram encontrados isolados com genótipos 1 e 7. Não houve associação que relacione os genótipos aos resultados obtidos nos testes de virulência (proteinase, fosfolipase e produção de biofilme) e susceptibilidade antifúngica (EUCAST e Etest). A análise filogenética das amostras 17 (genótipo 7), 47 (genótipo 4), 32 (genótipo 4) e 33 (genótipo 4), apresenta sua distinção com os demais isolados, o que se justifica devido ao fato de se tratar de cepas com genótipos diferentes das demais (genótipo 1).



## ABSTRACT

*Trichosporon* spp. are widely distributed in nature, comprehending countless species that inhabit different ecological niches, they can be found in water, soil and animals' body surfaces. In humans, this fungal genus is occasionally found as a member of the gastrointestinal microbiota and oral cavity; and, transiently, it can colonize the respiratory tract and skin. This microorganism has been classically associated with superficial infections, however, during the last decades, it has also been linked to infections' spread in immunocompromised patients, behaving as an opportunistic agent. Aiming to increase knowledge about this pathogenic agent, and assist in the understanding of aspects involving early diagnosis and proper therapy, this study aims to: re-identify phenotypically, genotypically and through mass spectrometry MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) (MALDI-TOF MS) *Trichosporon* genus yeasts of human, animal and environmental origin kept in a fungi collection (mycotheca); it also aims to determine and compare factors related to virulence: production of the phospholipase and proteinase enzymes, and the production of biofilm; evaluate the biofilms' susceptibility patterns to certain antifungals; evaluate the isolated fungi's susceptibility patterns against the antifungals fluconazole, itraconazole, amphotericin-B, voriconazole, and caspofungin, by comparing broth microdilution and Etest techniques. The level of agreement between the traditional phenotypic methodology and the molecular technique, among the identification of the 59 samples of *Trichosporon*, was 54.2%. The agreement on the identification between the MALDI-TOF and the molecular technique was 67.8%. No environmental isolate was identifiable by the means of MALDI-TOF MS, while 100% of these isolates were not in agreement in the IGS region's sequencing identification with the phenotypic characterization. Out of the total studied samples, the species that showed the highest frequency was *T. asahii* (52.6% - 31/59), followed by *T. debeurmannianum* (18,6% - 11/59), *T. inkin* (13.5 % - 08/59) and *T. dermatitis* (5.1% - 03/59). Among the total isolates, 89.8% and 96.6% did not present any activity for proteinase and phospholipase, respectively. The ability to form biofilm under the polystyrene plates' surface was observed in all isolates, with 54.3% of the samples considered to be highly productive. Regarding the antifungal susceptibility, voriconazole presented the lowest MIC values for human and animal samples in both studied methodologies and for environmental samples in the broth microdilution methodology. When the environmental samples were tested against the commercial Etest method, lower MIC values were observed against the antifungal amphotericin B. Caspofungin and fluconazole were the antifungals with the highest MICs. When comparing the two antifungal susceptibility techniques, the Etest method showed higher MIC values than the microdilution method. Regarding the sensibility of the biofilms, all of the species presented high values of MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> against the tested antifungals, however some of these species presented lower values of MIC. *T. coremiiforme* presented lower values of MIC for fluconazole, *T. montevidense* for itraconazole, *T. insectorum* for voriconazole and *T. veenhuisii* for both fluconazole and voriconazole. A genotypical analysis of 31 isolates of *T. asahii* was made, where 83,88% were identified as type 1 genotype, while genotypes 4 and 7 were also identified in 12,90% and 3,22% of the isolates, respectively. As for the geographic location, samples of the *T. asahii* of genotypes 1 e 4 were isolated in São Paulo-SP and Cuiabá-MT, and in Bauru-SP, isolates with the genotypes 1 and 7 were found. There was no evidence of a correlation between the genotypes and the results obtained in the virulence (proteinase, phospholipase and the production of biofilm) and antifungal susceptibility (EUCAST and Etest) tests. The phylogenetic analysis of the samples 17 (genotype 7), 47 (genotype 4), 32 (genotype 4) and 33 (genotype 4) presented a distinction from the other isolates, which is justified by the fact that they had strains with different genotypes than the others (genotype 1).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 01:</b> Esquema metodológico para realização de microcultivo.....                                                                                                          | 27 |
| <b>Figura 02:</b> Teste de Urease.....                                                                                                                                               | 28 |
| <b>Figura 03:</b> Turbidez observada na técnica de assimilação de carboidratos – Auxanograma.....                                                                                    | 29 |
| <b>Figura 04:</b> Placa com meio ágar <i>Mueller-Hinton</i> e tiras de Etest® após incubação para verificação da susceptibilidade antifúngica.....                                   | 36 |
| <b>Figura 05:</b> Características micromorfológicas dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....                                                                                     | 39 |
| <b>Figura 06:</b> Atividade das enzimas proteinase e fosfolipase das amostras de <i>Trichosporon</i> spp. distribuídas entre os grupos de origem humana, ambiental e animal.....     | 43 |
| <b>Figura 07:</b> Caracterização, em relação a formação de biofilme, das amostras de <i>Trichosporon</i> spp. distribuídas entre os grupos de origem humana, ambiental e animal..... | 44 |
| <b>Figura 08:</b> Predominância dos genótipos de <i>Trichosporon asahii</i> por sequenciamento da região IGS1.....                                                                   | 51 |
| <b>Figura 09:</b> Distribuição Geográfica dos genótipos de <i>Trichosporon asahii</i> por sequenciamento da região IGS1.....                                                         | 51 |
| <b>Figura 10:</b> Associação entre atividade enzimática e genótipos de <i>Trichosporon asahii</i> .....                                                                              | 52 |
| <b>Figura 11:</b> Associação entre capacidade de produção de biofilme em placas de poliestireno e genótipos de <i>Trichosporon asahii</i> .....                                      | 53 |
| <b>Figura 12:</b> Análise filogenética de 30 amostras de <i>Trichosporon asahii</i> com os genótipos dos isolados.....                                                               | 54 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 01:</b> Origem, procedência e sítio de isolamento das amostras utilizadas.....                                                                                                                                     | 25 |
| <b>Tabela 02:</b> Interpretação dos resultados de atividade enzimática.....                                                                                                                                                  | 33 |
| <b>Tabela 03:</b> Frequência das espécies entre as 59 amostras de <i>Trichosporon</i> identificadas por meio de amplificação e sequenciamento da região IGS1.....                                                            | 40 |
| <b>Tabela 04:</b> Frequência das espécies de <i>Trichosporon</i> distribuídas de acordo com a origem dos isolados (humano, animal e ambiental) e identificadas por meio de amplificação e sequenciamento da região IGS1..... | 41 |
| <b>Tabela 05:</b> Comparação da identificação de 59 amostras de <i>Trichosporon</i> spp. identificadas por sequenciamento da região IGS1, método fenotípico tradicional e espectrometria MALDI-TOF.....                      | 42 |
| <b>Tabela 06:</b> Atividade das enzimas proteinase e fosfolipase apresentada pelas 59 amostras de <i>Trichosporon</i> spp. estudadas.....                                                                                    | 43 |
| <b>Tabela 07:</b> Produção de biofilme distribuídas de acordo com a espécie de <i>Trichosporon</i> .....                                                                                                                     | 44 |
| <b>Tabela 08:</b> Produção de biofilme dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. distribuídas entre os grupos de origem humana, ambiental e animal.....                                                                       | 45 |
| <b>Tabela 09:</b> CIM50 e CIM90 dos 59 isolados de <i>Trichosporon</i> spp. frente a cinco antifúngicos por meio do método de Microdiluição EUCAST.....                                                                      | 46 |
| <b>Tabela 10:</b> CIM50 e CIM90 dos 59 isolados de <i>Trichosporon</i> spp. frente a cinco antifúngicos por meio do método comercial “Etest”.....                                                                            | 46 |
| <b>Tabela 11:</b> Valores de CIM50 e CIM90 das espécies de <i>Trichosporon</i> , frente a cinco antifúngicos estudadas por meio do método de microdiluição em caldo EUCAST e Etest.....                                      | 47 |
| <b>Tabela 12:</b> CIM50 e CIM90 dos biofilmes de 59 isolados de <i>Trichosporon</i> spp. frente a cinco antifúngicos por meio do método de microdiluição EUCAST.....                                                         | 48 |
| <b>Tabela 13:</b> CIM50 e CIM90 dos biofilmes formados pelas espécies de <i>Trichosporon</i> , frente a cinco antifúngicos estudados por meio do método de microdiluição em caldo EUCAST.....                                | 49 |
| <b>Tabela 14:</b> Análise de diversidade genotípica dos isolados de <i>Trichosporon asahii</i> por sequenciamento da região IGS1.....                                                                                        | 50 |

## ANEXOS

|                                                                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Anexo 1</b> - Coloração das colônias no meio cromogênico CHROMagar <i>Candida</i> ® das amostras de <i>Trichosporon</i> isoladas de material humano, animal e ambiental..... | 100 |
| <b>Anexo 2</b> - Características fenotípicas das leveduras do gênero <i>Trichosporon</i> spp. isoladas de amostras humana, animal e ambiental.....                              | 102 |
| <b>Anexo 3</b> - Assimilação e fermentação de carboidratos.....                                                                                                                 | 104 |
| <b>Anexo 4</b> - Resultados de identificação de amostras de <i>Trichosporon</i> obtidos por meio de técnicas fenotípicas, MALDI-TOF MS e técnicas moleculares.....              | 108 |

## SUMÁRIO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                        | 9  |
| 1.1 O GÊNERO <i>Trichosporon</i> .....                                    | 9  |
| 1.2 INFECÇÕES POR <i>Trichosporon</i> spp. ....                           | 11 |
| 1.2.1. Infecção superficial.....                                          | 11 |
| 1.2.2. Infecção sistêmica.....                                            | 13 |
| 1.2.3. Infecção em animais .....                                          | 14 |
| 1.2.4. <i>Trichosporon</i> no ambiente.....                               | 15 |
| 1.3. IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO .....                                        | 16 |
| 1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA.....                                           | 17 |
| 1.5. SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....                                    | 19 |
| 2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO .....                                             | 22 |
| 3. OBJETIVOS .....                                                        | 23 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                               | 24 |
| 4.1 AMOSTRAS .....                                                        | 24 |
| 4.2 INSTITUIÇÃO SEDE DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....                       | 26 |
| 4.3 RE-IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEVEDURAS .....                      | 26 |
| 4.3.1 CHROMagar <i>Candida</i> ® .....                                    | 26 |
| 4.3.2 Caracterização Fenotípica.....                                      | 26 |
| 4.3.2.1 Micromorfologia.....                                              | 27 |
| 4.3.2.2. Prova da Urease .....                                            | 27 |
| 4.3.2.3 Tolerância a Cicloheximida 0,1% .....                             | 28 |
| 4.3.2.4 Teste de Tolerância de Crescimento à 37°C .....                   | 29 |
| 4.3.2.5 Assimilação de Fontes de Carbono e Nitrogênio - Auxanograma ..... | 29 |
| 4.3.2.6 Fermentação de Carboidratos - Zimograma .....                     | 30 |
| 4.3.2.7 Chaves de Identificação Taxonômica.....                           | 30 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.3. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....                                      | 30 |
| 4.3.3.1 Extração de DNA.....                                               | 31 |
| 4.3.3.2 Técnica de PCR e Sequenciamento .....                              | 31 |
| 4.3.4 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF.....                               | 32 |
| 4.3.5 FATORES DE VIRULÊNCIA.....                                           | 33 |
| 4.3.5.1 Produção da Enzima Proteinase .....                                | 33 |
| 4.3.5.2 Produção da Enzima Fosfolipase.....                                | 33 |
| 4.3.5.3 Produção de Biofilme .....                                         | 33 |
| 4.3.6 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....                     | 34 |
| 4.3.6.1 Células Planctônicas .....                                         | 34 |
| 4.3.6.1.1 Microdiluição em Caldo .....                                     | 34 |
| 4.3.6.1.2 Etest .....                                                      | 35 |
| 4.3.6.2 Biofilmes .....                                                    | 37 |
| 4.3.6.3 Interpretação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs).....    | 38 |
| 4.3.7 DIVERSIDADE GENOTÍPICA .....                                         | 38 |
| 4.3.7.1 Genotipagem e análise filogenética de <i>T. asahii</i> .....       | 38 |
| 4.3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                             | 38 |
| 5. RESULTADOS .....                                                        | 39 |
| 5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>Trichosporon</i> spp. ....            | 39 |
| 5.2 FATORES DE VIRULÊNCIA.....                                             | 42 |
| 5.3 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS .....                                | 45 |
| 5.3.1. Células Planctônicas .....                                          | 45 |
| 5.3.2. Biofilmes .....                                                     | 48 |
| 5.4 DIVERSIDADE GENOTÍPICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA – <i>T. asahii</i> ..... | 50 |
| 6. DISCUSSÃO .....                                                         | 55 |
| 7. CONCLUSÕES .....                                                        | 69 |
| 8. REFERÊNCIAS .....                                                       | 71 |

## *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O GÊNERO *Trichosporon*

As leveduras do gênero *Trichosporon* spp. pertencem ao Filo Basidiomycota, Subfilo Agarimycotina, Classe Tremellomycetes, Ordem Tremellales e Família *Trichosporonaceae*. Estão amplamente distribuídos, sendo encontrados predominantemente em zonas tropicais e temperadas (Colombo *et al.*, 2011).

Este gênero compreende inúmeras espécies que habitam diferentes nichos ecológicos na natureza, podendo ser encontrados em substratos no meio ambiente, bem como na microbiota humana e animal. Em humanos, esta espécie fúngica ocasionalmente encontra-se como membro da microbiota gastrintestinal e cavidade oral e, transitoriamente, pode colonizar o trato respiratório, pele e vagina (Milan *et al.*, 2018; Galligam *et al.*, 2019, Castano *et al.*, 2020).

As leveduras do gênero *Trichosporon* são artrosporadas, possuem blastoconídios, hifas e pseudohifas hialinas 2 a 4 x 6 a 9 µm e em algumas espécies é possível verificar a presença de apressoria e macroconídios. Todas as espécies assimilam uma quantidade considerável de carboidratos e nitrogênio, porém não possuem capacidade de fermentação. São degradadoras de uréia e a sementeira em ágar Sabouraud dextrose possibilita um crescimento de velocidade moderada, podendo variar de 24 horas a 7 dias. Possuem colônias com coloração que varia do branco ao bege, úmidas a secas, inicialmente de aspecto liso, e com o passar do tempo se tornam rugosas ou cerebriforme (Lacaz *et al.*, 1998; De Hoog *et al.*, 2000; Bentubo, Gambale & Fischman, 2013).

O primeiro isolamento, em humanos, de leveduras do gênero *Trichosporon* ocorreu em 1867 por Rabenhorst, a partir de um cultivo de fios de cabelos de uma peruca, entretanto o agente etiológico em questão foi denominado como *Pleirococcus beigelli* (Rabenhorst, 1867). Em 1890, Behrend realizou a descrição de determinado fungo isolado de barba de um paciente com piedra branca e o classificou como *Trichosporon ovoides*, no qual *Trichos* submetia a pelos e *sporon* a esporos (Behrend, 1890). Outras pesquisas surgiram relatando a identificação de novas espécies, entretanto Vuillemin (1902) propôs que todos os isolados, até então descritos, seriam variações de uma mesma espécie, a qual recebeu o nome de *Trichosporon beigeli*, que significa levedura artrosporada (Guého *et al.*, 1992).

Em 1910, Beurman (1910) realizou o cultivo de um fungo oriundo de lesões cutâneas e o denominou de *Oidium cutaneum*, o qual foi renomeado posteriormente por Ota (1926) como *Trichosporon cutaneum*. A taxonomia do gênero permaneceu durante muitos anos de forma



simplista, fazendo com que os micologistas acreditassem na existência de apenas uma espécie, sendo *Trichosporon beigelli* (usado por clínicos) e *Trichosporon cutaneum* (usados por micologistas ambientais) sinônimos. Visando evitar confusões na nomenclatura, foi defendido que o nome mais adequado seria *Trichosporon beigelli* (Guého *et al.*, 1992; Kwon-chung & Bennett, 1992).

A análise baseada em aspectos macro e micromorfológicos associados a características fisiológicas não foram suficientes para a identificação de espécies de *Trichosporon* devido à heterogeneidade dos isolados, assim, tendo em vista estas dificuldades, Guého *et al.*, (1992) realizaram uma revisão taxonômica visando a reclassificação das espécies do gênero que se baseava em estudos moleculares da região 26S do DNA ribossomal (rDNA) associados às características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Com isto foi possível a identificação de 19 táxons do gênero *Trichosporon*, dos quais treze foram considerados sapróbios, sendo eles, *T. aquatile*, *T. brassicae*, *T. cerebriforme*, *T. dulcitum*, *T. faecale*, *T. gracile*, *T. jiroveci*, *T. laibachi*, *T. loubieri*, *T. moniliforme*, *T. motenvidense*, *T. pullulans* e *T. sporotricoides*. Foram considerados mais comumente causadores de doenças humanas *T. asahii*, *T. mucoides*, envolvidos em infecções sistêmicas, *T. ovoides*, *T. cutaneum* e *T. asteroides* causadores de piedra branca e outras infecções superficiais e *T. inkin* um patógeno de infecções superficiais e sistêmicas (Sugita *et al.*, 1998). Em 2003, Moylett e colaboradores relataram e revisaram casos na literatura de infecção por *T. pullulans* em pacientes com doenças granulomatosas. Rodriguez-Tudela *et al.* (2005) associam ainda *T. jirovecii* a infecção em humanos. Nos últimos anos outras espécies consideradas saprófitas também passaram a ser relatadas em infecções em humanos (Krcmery *et al.*, 1998; Padhye *et al.*, 2003; Girmenia *et al.*, 2005, Ruan *et al.*, 2009; Ogura *et al.*, 2012; Lara *et al.*, 2019). Com o advento das técnicas moleculares novas espécies foram descritas, e atualmente mais de 50 subespécies diferentes e cerca de 16 cepas diferentes são consideradas de interesse médico (Pagnocca *et al.*, 2010; Almeida-Junior *et al.*, 2016; Castano *et al.*, 2021).

A classificação das espécies do gênero *Trichosporon* se torna difícil por serem muito relacionadas filogeneticamente (Sugita *et al.*, 2002). Inicialmente, com base em análises de filogenética molecular, Colombo *et al.* (2011) subdividiram as espécies patogênicas de *Trichosporon* em três clados: clado Porosum, no qual foram incluídas as espécies *T. asahii*, *T. inkin*, *T. coremiiforme*, *T. asteroides*, *T. faecale*, *T. ovoides*, *T. japonicum*, e *T. lactis*; clado Cutaneum, que incluiu as espécies *T. mucoides*, *T. dermatitis*, *T. debeurmannianum*, *T. jirovecii*, e *T. cutaneum*; e o clado Gracile/Brassicae com inclusão das espécies *T. mycotoxinivorans*, *T.*

*montevideense*, *T. domesticum* e *T. loubieri*. A mais recente revisão taxonômica foi realizada por Liu *et al.* (2015), que conduziram uma aprofundada reclassificação filogenética das leveduras Tremelomicetos. Assim, as espécies formalmente atribuídas ao gênero *Trichosporon* foram divididas em cinco gêneros, *Apiotrichum* (21 espécies), *Cutaneotrichosporon* (10 espécies), *Effuseotrichosporon* (1 espécie), *Hagleromyza* (1 espécie) e *Trichosporon* (12 espécies). A maioria das espécies formalmente atribuídas a *Trichosporon* foram reclassificadas em três gêneros, *Apiotrichum*, *Cutaneotrichosporon* e *Trichosporon*. Este estudo possibilitou a modernização taxonômica de Tremellomycetes, bem como favoreceu maior entendimento da evolução dos gêneros, integrando a filogenia com aspectos bioquímicos, fisiológicos e características reprodutivas de basidiomicetos unicelulares e filamentosos nos Tremellomycetes (Liu *et al.*, 2015).

## **1.2 INFECÇÕES POR *Trichosporon* spp.**

### **1.2.1. Infecção superficial**

O gênero *Trichosporon* é responsável pela infecção superficial benigna denominada piedra branca, que corresponde a uma infecção crônica e assintomática da cutícula do pelo. As principais espécies associadas a esta infecção são *T. cutaneum*, *T. ovoides*, *T. inkin* e *T. loubieri* e as áreas geralmente acometidas são os pelos de barba, axilas, região pubiana e cabelo (Lacaz *et al.*, 2002; Silvestre *et al.*, 2010; Zhuang *et al.*, 2016; Cardona *et al.*, 2013). A piedra branca possui distribuição universal, porém é geralmente relatada em regiões de clima temperado e tropical. Em relação aos indivíduos acometidos, não existe distinção de faixa etária e acomete ambos os sexos, porém estudos apontam tendência em indivíduos do sexo feminino, o que pode estar associado ao uso de tiaras e aplicação de determinados produtos cosméticos que mantêm a umidade do cabelo por um tempo prolongado e acabam favorecendo a infecção fúngica (Pontes *et al.*, 2002; Diniz & Souza Filho, 2005; Castano *et al.*, 2021).

A forma de transmissão ainda não foi bem elucidada, entretanto alguns autores apontam fatores predisponentes como calor, umidade, hábitos precários de higiene, imunossupressão, antibioticoterapia, procedimentos invasivos, contato com animais de estimação e contato sexual nos casos de piedra branca genital (Marques *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2019).

A infecção é caracterizada pela presença de nódulos firmes e irregulares aderidos às hastes dos pelos com coloração que pode variar de branco a castanho claro. Não existem relatos de alterações no folículo piloso, entretanto podem ser encontradas, na pele adjacente, lesões

eritemato-descamativas mal delimitadas, úmidas e pruriginosas (Lacaz *et al.*, 2002; Diniz & Souza Filho, 2005).

O diagnóstico clínico dos casos de piedra branca deve ser cuidadoso, uma vez que são comuns os casos tratados equivocadamente como pediculose do couro cabeludo. A dificuldade diagnóstica se deve ao desconhecimento da ecologia, epidemiologia e principalmente do modo de transmissão da micose. Além disso, como sendo um membro da microbiota da pele, espécies de *Trichosporon* podem ser caracterizadas erroneamente como contaminantes, resultando em infecção atribuída a dermatófitos, quando de fato *Trichosporon* spp. pode ser o agente etiológico em 10 % – 40% das infecções superficiais dependendo da região geográfica e da população (Mariné *et al.*, 2015). Assim, devido à escassa literatura sobre o assunto e diagnóstico incorreto, a prevalência de piedra branca pode ser subestimada (Cardona *et al.*, 2013; Diniz *et al.*, 2020).

As espécies de *Trichosporon* também podem estar relacionadas com lesões nas unhas. Cerca de 5% - 10% dos casos de onicomicoses podem ser causados por leveduras, sendo que *Candida albicans* é a espécie mais comumente responsável por estas infecções (Mello *et al.*, 2021). No entanto, recentemente, espécies de *Trichosporon* também têm emergido como importantes agentes etiológicos de onicomicoses. O aumento da frequência de espécies de *Trichosporon* como agentes onicomicóticos é atribuído a fatores locais e sistêmicos, como exposição contínua da unha à umidade, profilaxia com fármacos antibacterianos e tratamento com imunossupressores (Han *et al.*, 2000; Koksall *et al.*, 2009; Capoor *et al.*, 2015; Kotwal *et al.*, 2018). *Trichosporon asahii*, *T. faecale*, *T. asteroides*, *T. mucoides*, *T. cutaneum*, *T. ovoides* e *T. inkin* são espécies mais relatadas na literatura como agentes etiológicos de micoses nas unhas (Rizzitelli *et al.*, 2016; Kiki-Barro *et al.*, 2017, Kotwal *et al.*, 2018).

Casos de otomicoses relacionadas ao isolamento de espécies do gênero *Trichosporon* também são descritos na literatura (Pontes *et al.*, 2009; Değerli *et al.*, 2012).

O tratamento para as infecções superficiais é baseado na adoção de medidas como a tricotomia, que consiste no corte do pelo da região acometida, conduta que acaba sendo não aderida por alguns pacientes quando a infecção acomete os pelos do couro cabeludo, pois agrega um grande impacto psicossocial, principalmente em indivíduos do sexo feminino. O uso de antifúngicos tópicos também é uma prática recomendada. No entanto, recidivas são frequentemente observadas (Diniz & Souza Filho, 2005; Ferreira *et al.*, 2019; Diniz *et al.*, 2020).

### 1.2.2. Infecção sistêmica

Durante as últimas décadas, infecções fúngicas causadas por agentes oportunistas apresentaram aumento considerável, estando associadas principalmente a pacientes imunocomprometidos (Paula *et al.*, 2007). As infecções sistêmicas por *Trichosporon* spp. vêm sendo consideradas a segunda causa mais comum de fungemia em pacientes com neoplasias malignas hematológicas (Liao *et al.*, 2015; Feugray *et al.*, 2019). No entanto, à medida que os derivados de triazol, como o fluconazol, se tornaram disponíveis, a incidência dessas infecções diminuiu (Kaufman *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2014). Atualmente, talvez devido à descoberta e introdução das equinocandinas, consideradas fármacos de escolha em muitas situações clínicas de alto risco para infecções fúngicas sistêmicas, observa-se a re-emergência deste patógeno, o qual exibe uma resistência intrínseca à estas drogas (Tanyildiz *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016; Sah *et al.*, 2019), apresentando-se relacionado às infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos, sobretudo em indivíduos apresentando neutropenia intensa (Walsh, *et al.*, 2004; Chagas-Neto *et al.*, 2009; Miceli *et al.*, 2011).

A tricosporonose, como é chamada a doença fúngica do tipo sistêmica, acomete principalmente pacientes imunossuprimidos, possui pobre prognóstico e, usualmente, taxa de mortalidade alta (Girmenia *et al.*, 2005; Chagas-Neto *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2009; Iturrieta-González *et al.*, 2014). Portadores de imunodeficiência humana adquirida, transplantados de órgãos e tecidos e indivíduos com doenças hematológicas malignas, como leucemias e linfomas, estão sujeitos às infecções por *Trichosporon* spp. (Meyer *et al.*, 2002; Iturrieta-González *et al.*, 2014). Além desses fatores, o uso de cateter venoso central, cateter urinário e dispositivos relacionados a cateter peritoneal também são comumente associados à doença (Lara *et al.*, 2019).

Desde o primeiro relato da doença na sua forma sistêmica (Watson & Kallichurum, 1970), outros casos da infecção foram descritos no Brasil e em outros países envolvendo diferentes cenários clínicos, entre eles fungemia, endocardite, peritonite e infecção urinária (Manzella *et al.*, 1982; Reinhart *et al.*, 1988; Moretti-Branchini *et al.*, 2001; Almeida-Junior *et al.*, 2014; Mattede *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016; Sah *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020).

Entre as espécies de *Trichosporon* com potencial patogênico, *T. asahii*, *T. asteroides* e *T. mucoides* são responsáveis pela maioria dos casos de tricosporonose, representando importantes patógenos oportunistas (Almeida Jr *et al.*, 2016). Recentemente, achados clínicos e microbiológicos têm relatado outras espécies de *Trichosporon* como patógenos humanos

capazes de causar infecções sistêmicas (Nath *et al.*, 2018; Lara *et al.*, 2019; Francisco *et al.*, 2019).

A tricosporonose pode se apresentar de duas formas, sendo elas, localizada ou disseminada. No primeiro caso a infecção é delimitada a um órgão ou a um sistema específico, enquanto no segundo caso a infecção acomete mais órgãos ou sistemas, podendo inclusive se disseminar para a corrente sanguínea (Jesus, 2018). A apresentação clínica mais comum é a fungemia (>70%), pneumonia e lesões na pele, sendo que a taxa de mortalidade relacionada a estas infecções varia entre 50% a 70%. Apesar da importância, fungemias por *Trichosporon* spp. são frequentemente negligenciadas e incorretamente diagnosticadas como infecções sanguíneas ocasionadas por outras leveduras, especialmente *Candida* spp. (Singh *et al.*, 2019).

A maioria das infecções sistêmicas por *Trichosporon* spp. provavelmente se inicia com a colonização das superfícies mucosa e cutânea, seguida do rompimento da integridade da superfície e subsequente disseminação por via hematogênica. Este rompimento pode ser secundário a danos epiteliais induzidos por cateteres intravasculares ou quimioterapia. O uso de antibióticos também pode aumentar a incidência e a extensão da colonização por meio da destruição da microbiota residente, elevando assim o risco da infecção sistêmicas (Castano *et al.*, 2021).

Apesar da crescente importância do gênero *Trichosporon* na medicina contemporânea, o tratamento de pacientes com tricosporonose permanece desafiador, uma vez que há poucos dados disponíveis em relação as atividades *in vitro* e *in vivo* de fármacos antifúngicos contra espécies clinicamente relevantes do gênero (Francisco *et al.*, 2019).

### 1.2.3. Infecção em animais

Ao longo dos últimos anos, a incidência de casos de micoses, principalmente profundas, causadas por fungos leveduriformes ou filamentosos em animais tem aumentado gradualmente. Similarmente a micoses em humanos, infecções micóticas em animais são causadas por uma variedade de patógenos, incluindo fungos como *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Trichosporon* spp. (Okabayashi *et al.*, 2009).

Em animais, existem relatos de infecções por *Trichosporon* spp. dos mais diversos tipos: mucosa oral e pelame de cães; cavidades naturais de gatos; glândulas mamárias de bovinos e caprinos, e por consequência no leite obtido destes animais; pele de porcos saudáveis; excreta de aves silvestres; cavidade oral, genitália e reto de peixe boi da Amazônia; narina de peixe boi marinho; pele de pandas gigantes; escamas de serpentes; intestino de galinhas; fezes de

morcegos; e até mesmo em casca de ovos de lagartos teiú (Spanamberg *et al.*, 2009; Spanamberg, 2010; Bentubo, Gambale & Fischman, 2010; Carregaro *et al.*, 2010; Campagner *et al.*, 2012; Santin *et al.*, 2013; Redü, 2014; Carvalho, 2015; Caldas, 2017; Ma *et al.*, 2019; Navarro *et al.*, 2020; Robinson *et al.*, 2020; Takashima *et al.*, 2020; Carvalho, 2020).

A relação existente entre a colonização e os fatores predisponentes de infecções oportunistas ainda é pouco discutida em medicina veterinária. O aumento da incidência de casos de micoses em animais e da resistência a fármacos antifúngicos tem sido motivos de preocupação entre os profissionais da saúde animal (Bentubo *et al.*, 2010).

Os fármacos antifúngicos usados para o tratamento de micoses profundas em animais, assim como em humanos, são polienos e azólicos. No entanto, a sensibilidade de isolados clínicos obtidos de animais para esses fármacos raramente é relatada (Okabayashi *et al.*, 2009).

#### **1.2.4. *Trichosporon* no ambiente**

Os fungos são de extrema importância para o ponto de vista ecológico, uma vez que participam do equilíbrio dos ecossistemas, visto que são organismos sapróbios e contribuem para a degradação da matéria orgânica, disponibilizando nutrientes ao solo, que futuramente poderão ser reaproveitados por demais organismos (Maia, 2017). A sua problemática relacionada ao meio ambiente se encontra quando sua presença deixa de ser natural e devido a algum descontrole origina um problema de saúde individual ou coletiva (Macedo, 2017).

Leveduras do gênero *Trichosporon* estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados predominantemente em zonas tropicais e temperadas. O gênero compreende inúmeras espécies que habitam diferentes nichos ecológicos na natureza como solo, madeiras em decomposição, ar, lagos, excrementos de pombos e bovinos. Seu isolamento já foi relatado em amostras de fezes de morcegos, obtidas em cavernas (Sugita *et al.*, 2005), também foi encontrado em pelame de alguns mamíferos, como macacos e cavalos (Kaplan, 1959). No habitat marinho e estuários, sua presença está altamente relacionada à poluição (Paula *et al.*, 1983; Loureiro, 2002; Guethi, 2009; Martins-Diniz *et al.*, 2005, Iqbal *et al.*, 2020). Sugita *et al.* (2000) consideram espécies de *Trichosporon*, principalmente *T. asahii*, como microrganismos comuns na natureza.

### 1.3. IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO

A identificação do gênero e da espécie dos diferentes patógenos faz-se importante para agregar conhecimentos do ponto de vista epidemiológico, para melhor definir uma associação clínica com as diferentes espécies e para estabelecer estratégias de prevenção e tratamento da doença (Taverna *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2016). A identificação de leveduras é etapa fundamental, também, para a monitorização das taxas de infecção hospitalar bem como para a identificação precoce de surtos de infecções (Colombo e Guimarães, 2003).

A identificação de espécies de *Trichosporon* por meio de métodos convencionais, baseados em características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, mostra-se insuficiente e frequentemente difícil e inconclusiva (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Iturrieta-González *et al.*, 2014; Almeida-Junior *et al.*, 2016, Espirito-Santo *et al.*, 2020). Um número considerável de novas espécies tem emergido durante as últimas décadas, tornando dificultosa a identificação por métodos convencionais (Dabas *et al.*, 2016). Os sistemas comerciais baseados em testes fenotípicos para identificar *Trichosporon* spp. são muito limitados em sua acurácia, devido à pouca quantidade de espécies incluídas na base de dados ou a capacidade inconsistente dos seus testes bioquímicos em identificar acuradamente as espécies em potenciais dentro do gênero (Castano *et al.*, 2021).

Procedimentos moleculares baseados no estudo do DNA têm sido amplamente utilizados e avaliados como métodos mais úteis e alternativos para a caracterização e identificação de *Trichosporon* spp. (Sugita *et al.*, 2002; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Iturrieta-González *et al.*, 2014; Dabas *et al.*, 2016; Santos, 2019). Sugita *et al.* (2002) descreveram uma análise da sequência da região do espaço intergênico 1 (IGS1) do DNA, e desde então é a principal ferramenta utilizada no diagnóstico molecular para diferenciação de espécies do gênero *Trichosporon*.

Além da utilização na identificação molecular, a região IGS1 também é amplamente utilizada como método de genotipagem para diferenciar isolados de *T. asahii* (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2007, Desnos-Ollivier *et al.*, 2020). Até o momento, 15 genótipos de *T. asahii* têm sido identificados (Almeida *et al.*, 2016) e vários estudos têm descrito a correlação entre os genótipos e a origem geográfica dos isolados e o sítio da infecção (Yang *et al.*, 2013; Taverna *et al.*, 2014; Cho *et al.*, 2015; Sellami *et al.*, 2017; Dabas *et al.*, 2016; Hazirolan *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019; Desnos-Ollivier *et al.*, 2020; Francico *et al.*, 2021), mostrando que a distribuição dos genótipos desta espécie pode variar entre as diferentes regiões e sítios

anatômicos. No Brasil, a maioria das cepas de *T. asahii* identificadas são pertencentes ao genótipo 1 (Chagas-Neto *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2016; Espírito-Santo *et al.*, 2020).

Outra abordagem que atualmente tem sido empregada é o perfil proteico total das espécies, principalmente evidenciado pela espectrometria de massa - MALDI-TOF (MALDI-TOF MS), mostrando-se como uma alternativa valiosa para a identificação rotineira de fungos. Além de ser uma técnica rápida, simples, ela também tem um ótimo custo-benefício se comparada a outras técnicas de identificação proteica (Almeida-Junior *et al.*, 2016; Monzani, 2019; Sah *et al.*, 2019). Estudos recentes analisando o desempenho do MALDI TOF MS para a caracterização de isolados leveduriformes, maioria *Candida* spp., relataram sucesso na identificação das espécies, com variação de 89% a 99% de concordância em comparação a técnica padrão-ouro baseada no sequenciamento de regiões IGS do DNA (Chao *et al.*, 2014; Almeida-Junior *et al.*, 2014; Ceballos-Garzón *et al.*, 2019; Pote *et al.*, 2020). Entretanto existe uma limitação de espécies não-*C. albicans* nos bancos de dados utilizados, inclusive para espécies de *Trichosporon*, o que pode acarretar uma identificação errônea se a mesma não for submetida a outros testes. Assim, uma base de dados robusta, incluindo isolados de *Trichosporon* corretamente identificados por meio de sequenciamento da região IGS1, com representantes da maioria das espécies que estão relacionadas a infecções, é necessária para identificar todo o espectro de doenças causadas por este microrganismo (Almeida-Junior *et al.*, 2014).

#### 1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA

A capacidade de um fungo causar danos ao seu hospedeiro pode estar relacionada a inúmeros fatores. Alguns desses fatores estão diretamente associados com o estado geral de integridade do hospedeiro enquanto outros estão mais comumente relacionados às características de virulência dos próprios agentes microbianos (Naglik *et al.*, 2004; Montoya *et al.*, 2015), ou seja, características expressas pelo microrganismo que facilitam o estabelecimento da infecção no hospedeiro (Höfs *et al.*, 2016).

Apesar de *Trichosporon* spp. representar a segunda ou terceira levedura não-*Candida* mais comum causando infecções invasivas, e com alta taxa de mortalidade em pacientes imunossuprimidos, poucos estudos na literatura têm relatado os fatores de virulência envolvidos na caracterização dos isolados (Di Bonaventura *et al.*, 2006; Chagas-Neto *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012; Iturrieta-González *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2016; Demir & Kustimur, 2014; Hazirolan *et al.*, 2018; Espírito-Santo *et al.*, 2020).



A maioria dos microrganismos patogênicos tem desenvolvido uma ampla variedade de fatores de virulência para auxiliar na sua capacidade de colonizar tecidos do hospedeiro, causar a doença e superar as defesas do mesmo. Entre eles, a secreção de exoenzimas tais como proteinases aspárticas e fosfolipases, hemolisinas, hialuronidase, formação de biofilmes, termotolerância, bem como a morfogênese têm sido bem estudados (Sabino *et al.*, 2011).

O estudo da atividade enzimática extracelular tem contribuído para o esclarecimento de muitos aspectos relacionados a ecologia e patogenicidade dos fungos (Gácsér *et al.* 2007; Bentubo & Gompertz, 2014). A expressão de enzimas extracelulares tem sido amplamente estudada em leveduras consideradas patogênicas ao homem e outros animais, principalmente em isolados de *Candida* spp., a mais importante em infecções superficiais e invasivas em humanos susceptíveis. Lipases são enzimas responsáveis pela hidrólise de triglicerídeos e a consequente produção de glicerídeos e ácidos graxos livres. As fosfolipases podem atuar sobre os fosfolipídeos presentes na membrana celular hospedeira. A literatura indica que as lipases, incluindo a fosfolipase, são importantes fatores na patogenicidade de Basidiomycetes, especialmente em leveduras do gênero *Trichosporon*, *Malassezia* e *Cryptococcus* (Dag e Cerikçioğlu, 2006; Da Silva *et al.*, 2006; Bentubo e Gompertz, 2014). As proteinases são enzimas extracelulares produzidas por patógenos, as quais desempenham importante papel na superação das barreiras imunológicas do hospedeiro. Bentubo e Gompertz (2014) observaram atividade da proteinase em 22 das 44 amostras de *Trichosporon* testadas. No entanto, em estudos realizados por Sun *et al.* (2012) e Demir e Kustimur (2014) todas as amostras de *Trichosporon* pesquisadas não expressaram atividade desta enzima. Estes achados sugerem que a produção de proteinases em *Trichosporon* spp. pode variar, refletindo a adaptação de cepas virulentas aos seus hospedeiros (Bentubo e Gompertz, 2014). Apesar dos relatos sobre a capacidade de cepas de *Trichosporon* para produzir estas enzimas, suas funções na patogênese de infecções invasivas humanas não estão bem esclarecidas.

A capacidade de adesão é outro atributo relacionado com o potencial patogênico das leveduras, podendo levar à formação de biofilme. Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (Kuhn, *et al.*, 2002). A capacidade de formação do biofilme pode ser considerada um potente fator de virulência que tem gerado atenção entre a comunidade científica e médica especificamente devido à sua capacidade de aumentar a mortalidade em pacientes com fungemia por *Candida* spp., (Tumbarello *et al.*, 2012), as quais

são frequentemente associadas com o crescimento de biofilmes sobre dispositivos médicos tais como cateteres venosos ou cateteres urinários (Serpa, 2016). A capacidade destas leveduras em aderir e colonizar superfícies plásticas, formando biofilmes, faz com que esses materiais se tornem um reservatório de microrganismos (Tamura *et al.*, 2003; Auler *et al.*, 2010).

Di Bonaventura *et al.*, (2006) foram os primeiros a descreverem, por meio da microscopia eletrônica, a cinética da formação de biofilmes e o desenvolvimento sobre superfícies de poliestireno por cepas de *T. asahii*, relatando a rapidez com que esta espécie realizou adesão neste material. Infecções invasivas por *Trichosporon* spp. são usualmente associadas ao uso de cateteres (Urs *et al.*, 2018). Estudos vêm sendo realizados para avaliar o papel do biofilme durante o curso de uma infecção por espécies *Trichosporon*, principalmente *T. asahii* (Di Bonaventura *et al.*, 2006; Paula *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2012; Iturrieta-González *et al.*, 2014; Cordeiro *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2016; Hazirolan *et al.*, 2018; Montoya *et al.*, 2017; Cordeiro *et al.*, 2017; Lara *et al.*, 2019; Kurakado *et al.*, 2020; Paldrychová *et al.*, 2019; Espirito-Santo *et al.*, 2020).

## 1.5. SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

A incidência crescente de infecções fúngicas invasivas provocadas por fungos oportunistas tem sido alvo de constante preocupação, acarretando a busca por tratamentos cada vez mais eficazes e fármacos cada vez mais seguros (Bentubo e Gompertz, 2014).

Os antifúngicos são classificados de acordo com o mecanismo de ação que apresentam frente a células fúngicas, e atualmente poucas classes de fármacos são aprovados a fim de serem efetivamente utilizadas nos tratamentos de infecções fúngicas (Chang *et al.*, 2017). Os antifúngicos existentes se classificam amplamente em dois grupos, sendo o primeiro caracterizado pelos fármacos que ocorrem naturalmente, como pode ser observado nos polienos e nas equinocandinas, enquanto o segundo grupo se caracteriza pelos fármacos de origem sintética, nos quais são incluídos os azóis e as pirimidinas fluoradas. Diversas preparações tópicas existem atualmente, visto a gama de infecções superficiais existentes, entretanto, quando se faz iminente o tratamento sistêmico, é necessário que a utilização dos agentes terapêuticos ocorra com supervisão médica, assim como para tratamento tópico, devido à potencial toxicidade apresentada (Rang *et al.*, 2016).

O uso terapêutico e profilático de agentes tais como os azóis menos tóxicos, principalmente o fluconazol, que frequentemente são administrados por períodos prolongados,

tem dado origem a casos de resistência aos antifúngicos entre as espécies susceptíveis (Ruiz *et al.*, 2013). Além disso, a ação fungistática dos azólicos e uso massivo na agricultura também representam uma forte pressão seletiva direcionando para a evolução da resistência (Revie *et al.*, 2018).

A quantidade de fármacos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas é relativamente limitada, o que configura preocupação para clínicos e microbiologistas envolvidos com o controle destas infecções. Os principais grupos de antifúngicos utilizados contra doenças fúngicas são o poliênico anfotericina B, os azólicos como cetaconazol e miconazol (imidazólicos) ou itraconazol, fluconazol e voriconazol (triazólicos), e as equinocandinas.

O poliênico anfotericina B atua diretamente no ergosterol destruindo o gradiente de prótons da membrana fúngica. Os azólicos interagem com a enzima lanosterol 14 $\alpha$  demetilase, um citocromo P-450 que está envolvido na biossíntese do ergosterol. A inativação da enzima culmina no acúmulo de esteróis metilados, precursores do ergosterol, alterando a estrutura e função da membrana fúngica, causando significativa inibição do crescimento do fungo (Perfect, 2017; Shafiei *et al.*, 2020). As equinocandinas são fármacos que inibem a síntese da beta-(1,3)-glucana que é um componente da parede celular de muitos fungos filamentosos e de leveduras (Robbins *et al.*, 2016; Revie *et al.*, 2018).

A sensibilidade a antifúngicos *in vitro*, de fungos leveduriformes e filamentosos, pode ser avaliada utilizando técnicas de referência padronizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou pelas diretrizes publicadas pelo *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST). Utilizando essas técnicas, que consistem em métodos de microdiluição em caldo, é possível encontrar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e determinar se o microrganismo é sensível ou resistente, *in vitro*, a determinado fármaco quando há ponto de corte estabelecido. Os dados obtidos a partir dos testes realizados seguindo essas diretrizes podem ser utilizados para comparação com dados clínicos (Arendrup *et al.*, 2016). Nos protocolos do CLSI e EUCAST (CLSI – M27 S3, 2008; CLSI – M60 (2017); Arendrup *et al.*, 2015) o gênero *Trichosporon* não está incluído, no entanto, os estudos de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos de espécies de *Trichosporon* utilizam como referência as normas padronizadas para *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. (Arikan & Hasçelik, 2002).

Nos últimos anos, entretanto, um grande número de “kits” comerciais tem sido introduzido como alternativas rápidas e de fácil utilização, principalmente em emergências médicas. Neste contexto, um método muito utilizado é o “Etest”, um sistema comercial para

avaliar a susceptibilidade antifúngica, baseado na difusão em meio sólido de diferentes concentrações de um fármaco incorporado em tiras plásticas, e que permite definição rápida da CIM do antimicrobiano. Em comparação com outros métodos existentes, o Etest mostra-se como uma prova mais rápida e de fácil realização (Espinell-Ingroff *et al.*, 2017, 2019).

Testes *in vitro*, utilizando técnicas de referência atestada, têm sido realizados para avaliar a susceptibilidade de leveduras do gênero *Trichosporon*. Existem dados que relatam atividade, *in vitro* e *in vivo*, limitada da anfotericina B frente a *Trichosporon* spp., principalmente amostras de *T. asahii* (Girmenia *et al.*, 2005; Tokimatsu *et al.*, 2007; Chagas-Neto *et al.*, 2009; Dabas *et al.*, 2016). Valores de CIM para anfotericina B frente a isolados de *Trichosporon* spp.; geralmente são incompatíveis com os níveis séricos normalmente alcançáveis em pacientes que recebem uma formulação convencional deste polieno (Colombo *et al.*, 2011).

Os azóis têm apresentado melhor atividade antifúngica *in vivo* e *in vitro* sobre *Trichosporon* spp. quando comparado aos demais antifúngicos (Suzuki *et al.*, 2010; Dabas *et al.*, 2016; Francisco *et al.*, 2019), sendo que estudos descrevem o voriconazol como uma opção terapêutica para infecções por *Trichosporon* spp. (Paphitou, *et al.*, 2002; Asada *et al.*, 2006; Serena *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020).

As equinocandinas têm pouca ou nenhuma atividade antifúngica frente a amostras de *Trichosporon* spp. e não são recomendadas no tratamento das tricosporonoses (Walsh *et al.*, 2004; Dabas *et al.*, 2016). Este gênero é intrinsicamente resistente a esta classe de fármaco antifúngico (Almeida *et al.*, 2016), no entanto, a combinação da equinocandina com anfotericina B ou azóis parece ter algum efeito sinérgico antifúngico *in vivo* e *in vitro* (Serena *et al.*, 2006).

Recentemente, isolados de *Trichosporon* spp. multidroga-resistente têm sido relacionados ao aumento do uso de triazóis de amplo espectro em pacientes de alto risco (Oliveira dos Santos *et al.*, 2016).

Apesar da crescente relevância do gênero *Trichosporon* na medicina contemporânea, o tratamento de pacientes com tricosporonose permanece um desafio, uma vez que poucos são os dados atuais a respeito da comparação entre as atividades *in vitro* e *in vivo* das drogas antifúngicas frente as espécies clinicamente importantes, bem como estudos que comparem diferentes regimes antifúngicos no tratamento dessas infecções (Iturrieta-González *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2016). Dificuldades na identificação das espécies dentro do gênero e a ausência de padronização dos testes de sensibilidade *in vitro* contribuem na manutenção deste cenário.

*Relevância do Estudo*

## 2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Pesquisas demonstram que infecções por *Trichosporon* têm sido cada vez mais relatadas mundialmente, no entanto torna-se evidente que há poucas informações disponíveis sobre as características destas infecções principalmente no Brasil. Portanto, mais informações em relação a diversidade fenotípica, perfil epidemiológico das infecções, fatores de virulência e peculiaridades de sensibilidade antifúngica de leveduras do gênero *Trichosporon* são essenciais para explorar questões importantes voltadas aos aspectos que envolvem agente etiológico, diagnóstico precoce e terapia adequada, principalmente em pacientes hospitalizados.

*Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

Baseando-se nas considerações descritas quanto a importância de mais pesquisas relacionadas às leveduras do gênero *Trichosporon*, somado ao fato de existirem inúmeras deficiências na habilidade de prevenção, diagnóstico precoce e principalmente quanto ao tratamento de tricosporonoses, este trabalho apresenta como objetivos:

- ✓ Re-identificar fenotipicamente, genotipicamente e por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF) leveduras do gênero *Trichosporon* de origem humana, animal e ambiental mantidas em micoteca;
- ✓ Determinar e comparar os fatores relacionados à virulência de leveduras do gênero *Trichosporon* de origem humana, animal e ambiental: secreção das enzimas proteinase e fosfolipase e capacidade de formação de biofilme;
- ✓ Avaliar os padrões de susceptibilidade das células planctônicas frente ao fluconazol, itraconazol, anfotericina-B, voriconazol e caspofungina comparando as técnicas de microdiluição em caldo EUCAST e Etest;
- ✓ Avaliar os padrões de susceptibilidade das células dos biofilmes frente ao fluconazol, itraconazol, anfotericina-B, voriconazol e caspofungina;
- ✓ Caracterizar e comparar a diversidade genotípica e realizar análise filogenética dos isolados identificados como *Trichosporon asahii* de origem humana, animal e ambiental;
- ✓ Estudar a associação genótipo-susceptibilidade antifúngica, avaliando se a diversidade genética dos isolados de *T. asahii* está associada com diferentes comportamentos frente aos antifúngicos testados no estudo.



*Materiais e Métodos*

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

Nesta pesquisa foram incluídas 59 amostras de leveduras do gênero *Trichosporon*, sendo 44 amostras de origem humana, 04 amostras de origem animal e 11 amostras de origem ambiental (Tabela 01). As amostras isoladas na cidade de Bauru-SP fazem parte da micoteca do Laboratório de Micologia e Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) CLR II Bauru-SP, aquelas isoladas nas demais regiões geográficas foram gentilmente cedidas por Dra. Claudete Rodrigues de Paula do Laboratório de Leveduras Patogênicas da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Dr. Hans Garcia Garces do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Setor de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Dr. Diniz Pereira Leite Junior do Laboratório de Pesquisa em Micologia da Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá- MT e Dra. Viviane Mazo Fávero Gimenes do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP

As amostras estão preservadas em ágar Sabouraud dextrose e em glicerol no freezer - 80°C, no Laboratório de Micologia e Parasitologia do IAL CLRII Bauru-SP. Para os estudos realizados neste trabalho foram incluídas, nos devidos experimentos, as cepas de referência *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. albicans* (ATCC 102310), *C. albicans* (ATCC 2512), *C. albicans* (ATCC 90028), *C. albicans* (12A), *Cryptococcus neoformans* (ICB162C), *Trichosporon asahii* (CBS2479), *T. inkin* (CBS5585), *T. mucoides* (CBS7625) e *T. ovoides* (CBS7556).

**Tabela 01:** Origem, procedência e sítio de isolamento das amostras utilizadas.

| <b>Nº</b> | <b>Origem</b>  | <b>Procedência</b> | <b>Sítio de Isolamento</b>  |
|-----------|----------------|--------------------|-----------------------------|
| 1         | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 2         | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 3         | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 4         | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 5         | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 6         | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 7         | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 8         | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 9         | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 10        | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 11        | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 12        | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 13        | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 14        | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 15        | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Urina                       |
| 16        | Clínica Humana | Bauru – SP         | Urina                       |
| 17        | Clínica Humana | Bauru – SP         | Urina                       |
| 18        | Clínica Humana | Botucatu – SP      | Raspado de Pele             |
| 19        | Clínica Humana | Bauru – SP         | Abcesso de Ferida Cirúrgica |
| 20        | Clínica Humana | França             | Sangue                      |
| 21        | Clínica Humana | França             | Sangue                      |
| 22        | Clínica Humana | França             | Sangue                      |
| 23        | Clínica Humana | França             | Sangue                      |
| 24        | Clínica Humana | França             | Sangue                      |
| 25        | Clínica Humana | São Paulo – SP     | Secreção de Pele            |
| 26        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pelo Perineal               |
| 27        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Unha                        |
| 28        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Secreção Traqueal           |
| 29        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pele de Pênis               |
| 30        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pele Inguinal               |
| 31        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Unha                        |
| 32        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pele Inguinal               |
| 33        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pele Inguinal               |
| 34        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Unha                        |
| 35        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Axila                       |
| 36        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pele de Nádegas             |
| 37        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pelo Perineal               |
| 38        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pele de Nádegas             |
| 39        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pelo Inguinal               |
| 40        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Urina                       |
| 41        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Pelo Perineal               |
| 42        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Urina                       |
| 43        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Couro Cabeludo              |
| 44        | Clínica Humana | Cuiabá – MT        | Barba                       |
| 45        | Clínica Animal | São Paulo – SP     | Mucosa Oral de Cão          |

*Continua...*

...Continuação

| Nº | Origem         | Procedência        | Sítio de Isolamento     |
|----|----------------|--------------------|-------------------------|
| 46 | Clínica Animal | São Paulo – SP     | Mucosa Oral de Cão      |
| 47 | Clínica Animal | São Paulo – SP     | Mucosa Oral de Cão      |
| 48 | Clínica Animal | Botucatu – SP      | Raspado de Pele de Galo |
| 49 | Ambiental      | Santos – SP        | Água do Mar             |
| 50 | Ambiental      | Santos – SP        | Água do Mar             |
| 51 | Ambiental      | Santos – SP        | Areia de Praia          |
| 52 | Ambiental      | São Sebastião – SP | Água do Mar             |
| 53 | Ambiental      | São Sebastião – SP | Água do Mar             |
| 54 | Ambiental      | São Sebastião – SP | Água do Mar             |
| 55 | Ambiental      | São Sebastião – SP | Água do Mar             |
| 56 | Ambiental      | São Sebastião – SP | Água do Mar             |
| 57 | Ambiental      | São Sebastião – SP | Areia de Praia          |
| 58 | Ambiental      | São Sebastião – SP | Areia de Praia          |
| 59 | Ambiental      | Santos – SP        | Areia de Praia          |

## 4.2 INSTITUIÇÃO SEDE DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA

O estudo foi executado no Núcleo de Ciências Biomédicas, do Centro de Laboratórios Regionais, do Instituto Adolfo Lutz CLR-II, Bauru.

## 4.3 RE-IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEVEDURAS

### 4.3.1 CHROMagar *Candida*®

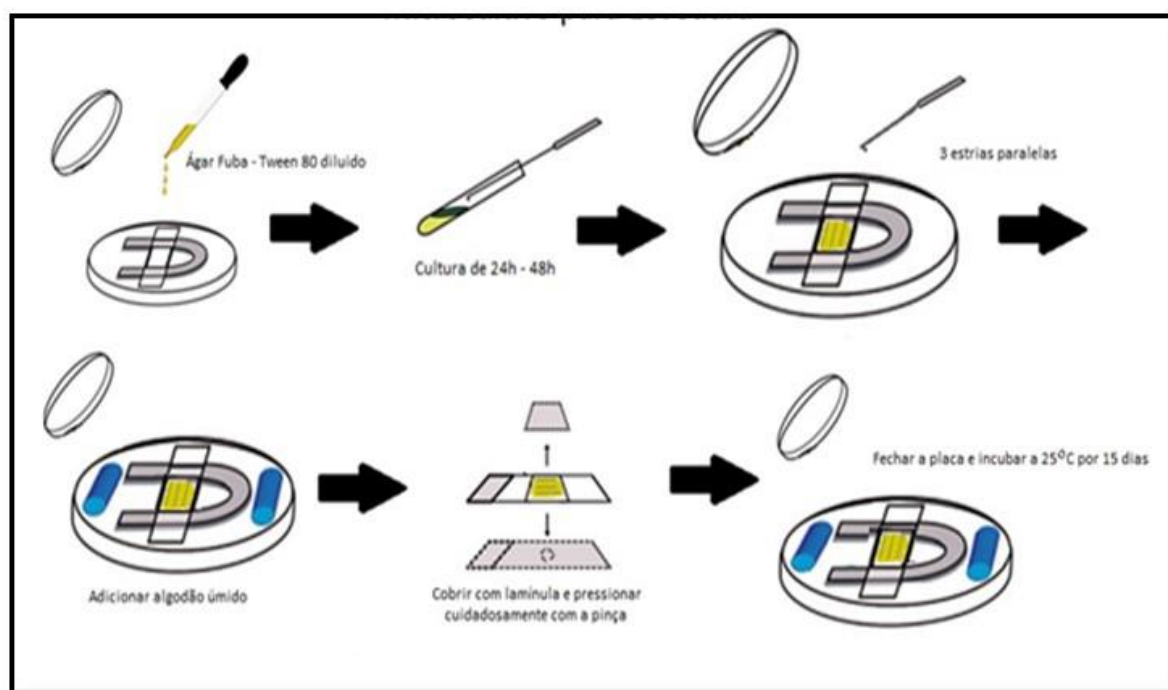
Antes da realização das técnicas para o estudo, todas as amostras foram semeadas por meio do método de esgotamento em meio cromogênio CHROMagar *Candida*®, para constatação de pureza e viabilidade. As placas foram incubadas à 37°C por até 48 horas. Após, as cepas consideradas puras e viáveis foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, para realização das futuras análises. Também foi avaliado o comportamento cromogênico das leveduras quando semeadas em meio diferencial.

### 4.3.2 Caracterização Fenotípica

A re-identificação fenotípica das cepas foi realizada por meio do método tradicional, no qual as leveduras foram re-estudadas quanto as suas características macroscópicas, microscópicas, reprodutivas e fisiológicas, de acordo com os métodos preconizados por Kurtzman, Fell & Boekhout (2011). Os testes incluíram micromorfologia, prova de urease, tolerância a cicloheximida 0,1%, crescimento à 37°C, auxanograma e zimograma.

#### 4.3.2.1 Micromorfologia

O estudo das características microscópicas das leveduras foi realizado por meio da prova de microcultivo. Foram utilizadas placas de Petri contendo lâminas dispostas, de modo que, uma lâmina para suporte e outra lâmina para cultivo. Sobre a lâmina de cultivo foi distribuído, com auxílio de uma pipeta, o meio de cultura liquefeito Corn Meal ágar acrescido de Tween 80. Após a solidificação, um pequeno inóculo da colônia leveduriforme estudada, foi semeado em estrias (3 estrias) com auxílio da alça de platina. Foi colocada uma lamínula estéril sobre as estrias semeadas. Uma pequena bola de algodão embebida em água destilada estéril foi colocada na placa, que logo após foi fechada e incubada a 25°C durante 15 dias. Após este período, foi adicionado a placa 0,5mL de formol e deixado agir por uma hora. A lâmina foi, então, examinada em microscópio óptico para a pesquisa de hifas, pseudohifas, artroconídios, blastoconídios, apressoria e outras estruturas importantes na identificação de leveduras (Figura 01).



**Figura 01:** Esquema metodológico para realização de microcultivo.

#### 4.3.2.2. Prova da Urease

A prova da urease foi realizada por meio do teste de hidrólise de uréia de Christensen (Christensen, 1946), na qual metaloenzimas produzidas pelo microrganismo promovem a hidrólise de uréia presente no meio de cultura para produzir amônia e dióxido de carbono,

alterando, assim, o pH do mesmo. Para realização da técnica foram utilizados repiques de 48 horas que após a semeadura em meio ureia de Christensen foram incubadas por até 48 horas à 37°C. A positividade do teste foi observada quando ocorreu alteração da coloração do meio de cultura de amarelo para rosa intenso, devido a alcalinização do meio que se torna evidente devido a presença do indicador de pH (vermelho de fenol), conforme pode ser observado na Figura 02. As leveduras do gênero *Trichosporon* são urease positiva.



**Figura 02:** Teste de Urease. A: *Trichosporon* spp. (urease +); B: *Cryptococcus* spp. (controle positivo); C: *Candida* spp. (controle negativo).

#### 4.3.2.3 Tolerância a Cicloheximida 0,1%

Culturas de 48 horas de cada isolado foram semeadas em meio ágar Sabouraud dextrose acrescido de 0,1% de cicloheximida, em seguida foram incubadas por até 72 horas 37°C para verificação do crescimento e tolerância a cicloheximida.

#### 4.3.2.4 Teste de Tolerância de Crescimento à 37°C

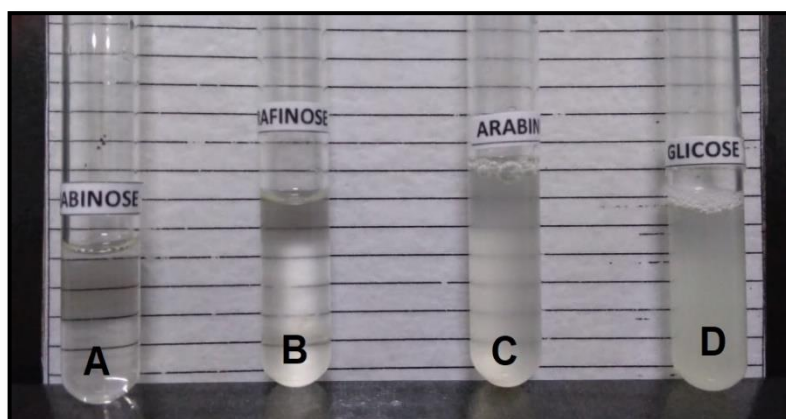
Os isolados foram semeados em ágar Sabouraud dextrose e incubados à 37°C durante um período de 10 dias, leituras diárias foram realizadas para observar a existência do crescimento leveduriforme no meio de cultura.

#### 4.3.2.5 Assimilação de Fontes de Carbono e Nitrogênio - Auxanograma

Neste teste é observada a capacidade do microrganismo em assimilar diferentes fontes de carbono e nitrogênio (Middelhoven *et al.*, 1984; Kurtzman, Fell e Boekhout, 2011).

Para assimilação de fontes de carbono foi utilizado caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) acrescido de diferentes açúcares como fontes de carbono em concentração de 0,5%. A partir de uma cultura de 48 horas foi preparada uma suspensão em água destilada estéril com turvação equivalente a escala 2 de *MacFarland*. Em cada tubo contendo o YNB acrescido da fonte de carbono, foi adicionado 0,1mL da suspensão de levedura. As leveduras inoculadas foram incubadas à 25°C por 20 dias com leituras realizadas em intervalos de cinco dias. Para a leitura foi analisada a turbidez do meio com auxílio de um cartão de *Wickerhan*. Quando a turbidez do meio dificultava a visualização das linhas do cartão, o teste foi considerado positivo, conforme observado na Figura 03 (Magalhães, 2008).

A técnica e leitura para assimilação de fontes de nitrogênio, seguiu os mesmos procedimentos daquela para assimilação de fontes de carbono, no entanto o meio de cultura utilizado foi o *Yeast Carbon Base* (YCB) e como fonte de nitrogênio foram acrescidos ao meio a peptona e o nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>).



**Figura 03:** Turbidez observada na técnica de assimilação de carboidratos – Auxanograma A- Controle negativo; B – Leve turbidez considerada como resultado negativo; C e D turbidez que dificulta a visualização das linhas, consideradas como resultado positivo.

#### 4.3.2.6 Fermentação de Carboidratos - Zimograma

Esta técnica verifica a capacidade do microrganismo fermentar carboidratos e, em conjunto com o teste de assimilação de carboidratos completa o perfil bioquímico leveduriforme.

Em tubos contendo meio basal constituído de peptona e extrato de levedura (pH 7,0) e com tubos de *Durham*, foram adicionados açúcares na concentração de 2%. Para realização da técnica foi preparado uma suspensão das leveduras, com crescimento prévio de 48 horas, em 2mL de salina 0,85%, com turbidez compatível a escala 0.5 de *MacFarland*. Em seguida, foram adicionados 50µL da suspensão em cada tubo com meio de cultura, açúcar e tubo de *Durham*. Os tubos foram incubados à 25°C durante 15 dias, com leituras diárias. A positividade foi observada por meio do aparecimento de uma bolha no interior do tubo de *Durham*.

#### 4.3.2.7 Chaves de Identificação Taxonômica

Para a identificação de leveduras do gênero *Trichosporon* foram utilizadas duas chaves de assimilação de substratos de carbono e nitrogênio: a descrita por Kurtzman, Fell & Boekhout (2011), que possibilita a identificação de *T. aquatile*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. brassicae*, *T. caseorum*, *T. coremiiforme*, *T. cutaneum*, *T. debeurmannianum*, *T. dehoogii*, *T. dermatis*, *T. domesticum*, *T. dulcitum*, *T. faecale*, *T. gamsii*, *T. gracile*, *T. guehoae*, *T. inkin*, *T. japonicum*, *T. jirovecii*, *T. lactis*, *T. laibachii*, *T. lignicola*, *T. loubieri*, *T. moniliiforme*, *T. montevidense*, *T. mucoides*, *T. mycotoxinivorans*, *T. ovoides*, *T. porosum*, *T. scarabaeorum*, *T. siamense*, *T. smithiae*, *T. sporotrichoides*, *T. terrícola*, *T. vadense*, *T. veenhuisii* e *T. wieringae*; e a chave descrita por Rodriguez-Tudela *et al.*, (2005), que possibilita a identificação de *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. coremiiforme*, *T. cutaneum*, *T. dermatis*, *T. faecale*, *T. inkin*, *T. japonicum*, *T. jirovecii*, *T. montevidense*, *T. mucoides* e *T. ovoides*. Esta última, além dos açúcares, também utiliza outros três testes que fazem parte da chave de identificação: termotolerância, tolerância a cicloheximida 0,1% e presença ou não de célula apresoria.

#### 4.3.3. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

Após estudo fenotípico, os isolados foram estudados molecularmente através da análise da região IGS1 do rDNA.



#### 4.3.3.1 Extração de DNA

As amostras foram semeadas em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas por um período de 48 horas. A extração seguiu conforme protocolo comercial do kit de extração *Tissue & Cells Genomic Prep. Mini Spin Kit* (GE-Healthcare) indicado pelo fabricante, com modificação apenas no tempo de incubação em agitador, que foi padronizado para 24 horas. A quantificação e pureza do DNA extraído de cada amostra foram dosadas por absorvância em espectrofotômetro (260/280nm), em aparelho Epoch (Biotech).

#### 4.3.3.2 Técnica de PCR e Sequenciamento

A amplificação da região IGS1 foi realizada utilizando os *primers* 26SF (IGS1-26SS) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e 5SR (IGS2-58S) (5'-AGCTTGACTTCGCAGATCGG-3') (Sugita *et al.*, 2002) em reações de 50µL contendo 0,5µM de cada *primer*, 0,2mM de cada dNTP, 5µL de tampão 10x, 2,5U de *Taq* Polimerase e 10ng de DNA. A amplificação foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, seguida por 38 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C, e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com 0,1µL/mL de SYBR Safe (Invitrogen, USA) em solução tampão TBE 1x por 60 minutos a 110V. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (296nm), registrada com transiluminador (Syngene, USA) e as imagens capturadas por sistema de documentação digital. Os produtos amplificados foram purificados e, então, enviados ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista de Botucatu –SP (IBETEC) para sequenciamento. Após, os *amplicons* foram visualizados em *software* Chromas 2.3 Technelysium, Helensvale, Australia, alinhados por meio do programa MEGA 7 (KUMAR *et al.*, 2016), submetidos ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparados com as sequências disponíveis no GenBank. Identidade mínima acima de 98% foram aceitas para considerar a identificação molecular.

#### 4.3.4 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

Para realização da técnica foram utilizados MALDI-TOF Vitek com o banco de dados *Saramis e Myla* e o MALDI TOF *Bruker Daltonics* com o banco de dados *Biotyper-Flexcontrol*. As técnicas foram realizadas na Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, São Paulo-SP e no Instituto Adolfo Lutz Central, São Paulo-SP, respectivamente.

As cepas foram incubadas por 48 horas a 30°C em ágar Sabouraud dextrose. Após análise da pureza da amostra, uma colônia escolhida foi transferida por meio de alça bacteriológica para microtubo de 1,5mL contendo 1 mL de água purificada estéril. Após agitação em vórtex por 1 minuto, os microtubos foram centrifugados à 13.000 rpm durante 2 minutos. Após centrifugação, os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos. Em seguida, 300 µL de água purificada foi adicionada aos sedimentos, que novamente foram agitados. Finalizada esta etapa, foi adicionado a cada microtubo 900 µL de etanol absoluto, em seguida agitados por 1 minuto e centrifugados a 13.000 rpm durante 2 minutos. Todo o sobrenadante foi retirado e nova centrifugação foi realizada, buscando retirar qualquer resíduo de etanol da amostra para evitar interferências no processo de identificação. Após descarte do sobrenadante o sedimento foi disposto para secar em temperatura ambiente. Em seguida, 10µL do sedimento foi homogeneizado com 50µL de ácido fórmico 70%. Os microtubos foram agitados e 50 µL de acetonitrila foram adicionados a suspensão. A mistura foi, então, novamente centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos. Logo após, 1µL do sobrenadante foi adicionado a placa de aço MALDI, que secou em temperatura ambiente. Em sequência foi adicionado 1µL da matriz indicada pelo fabricante. Após secagem em temperatura ambiente a análise foi realizada em triplicata, para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. Por fim, os espectros no intervalo de massa  $m/z = 2.000$  a  $20.000$  foram obtidos e analisados nos bancos de dados. (Lima-Neto *et al.*, 2014). Os resultados foram expressos em *score* e, segundo o fabricante, valores de *score* entre 0.000 a 1.699 não são confiáveis para identificação, valores de *score* de 1.700 a 1.999 indicam a provável identificação do gênero, valores de *score* de 2.000 a 2.299 correspondem a identificação segura do gênero e provável identificação da espécie, enquanto que valores de *score* de 2.300 a 3.000 indicam alta probabilidade de identificação da espécie.

### 4.3.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

#### 4.3.5.1 Produção da Enzima Proteinase

Para esta técnica foi utilizado o meio sólido para pesquisa de proteinase (Rüchel *et al.*, 1982). As amostras obtidas de um crescimento prévio de 48 horas foram semeadas em quatro pontos equidistantes sobre o meio de cultura em placas de Petri. Em seguida foram incubadas a temperatura ótima para o crescimento (25°C ou 37°C dependendo da cepa) por 18 dias. A positividade do teste foi verificada através da formação de um halo translúcido ao redor da colônia, o que indica a degradação da proteína existente no meio.

A atividade enzimática (Pz) foi medida segundo Price *et al.* (1982), utilizando-se a razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de degradação (ddc), ou seja,  $Pz = dc/ddc$ . Os resultados de Pz foram interpretados como descritos na Tabela 02.

**Tabela 02:** Interpretação dos resultados de atividade enzimática.

| Pz                | Atividade Enzimática | Código |
|-------------------|----------------------|--------|
| = 1,0             | Negativa             | 1      |
| $\geq 0,64 < 1,0$ | Positiva             | 2      |
| < 0,64            | Fortemente Positiva  | 3      |

#### 4.3.5.2 Produção da Enzima Fosfolipase

A execução do teste foi a mesma que proposta para pesquisa da proteinase, sendo a pesquisa realizada em meio ágar fosfolipase (Price *et al.*, 1982; Willianson *et al.*, 1986). A presença da enzima foi observada pela formação de uma zona opaca de precipitação ao redor da colônia da levedura e atividade enzimática foi medida e interpretada da mesma forma que para a proteinase, conforme descrito anteriormente.

#### 4.3.5.3 Produção de Biofilme

Com o propósito de verificar a habilidade das amostras de leveduras em produzir biofilme, foi utilizada metodologia preconizada por Cordeiro *et al* (2017), Li *et al.* (2003) e Jin *et al.* (2003), com algumas modificações. As amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose de 25°C a 37°C por 48 horas. A partir do crescimento obtido foi preparado um inóculo padronizado com 3 mL de salina, sendo a turbidez compatível a escala 4 de *MacFarland*. Aliquotas de 100µl do inóculo foram transferidas para a placa de poliestireno em triplicada. Em

seguida foram adicionados 180µl de Sabouraud caldo suplementado com 8% de glicose. As placas foram incubadas a 25°C ou 35°C por um período de 6 horas para o tempo de adesão das células no substrato. Após incubação as placas foram aspiradas e lavadas com *Phosphate Buffer Solution* (PBS) acrescido de Tween 20% para a remoção das células não aderidas. Uma nova incubação em temperatura de 25°C ou 35°C foi realizada por um período máximo de 72 horas para que ocorresse a maturação dos biofilmes. Após esta incubação, a placa foi novamente lavada por duas vezes com PBS - Tween 20%. Posteriormente foram adicionados 100µl de metanol 100% para desidratação do biofilme. Após 5 minutos o metanol foi retirado e a placa foi disposta no fluxo laminar para secagem a temperatura ambiente. Finalizando esta etapa, 200µl de cristal violeta a 0,3% foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 20 minutos. O corante foi removido após o tempo estipulado e a placa foi lavada duas vezes com água destilada. Para remoção do corante impregnado nos biofilmes, foram adicionados 200µL de ácido acético em cada poço, e o sobrenadante foi transferido para novas placas de poliestireno com fundo chato para leitura em espectrofotômetro a 590 nm. Os valores de absorbância dos controles negativos foram subtraídos dos valores observados pelas cepas testadas, minimizando-se assim possíveis interferências. Cada amostra foi testada três vezes, e a quantificação da produção de biofilme foi relatada como a média aritmética dos valores de absorbância das triplicatas.

Para categorizar a produção de biofilme os isolados foram considerados como fracos produtores ( $A_{595} \leq 0.531$ ), produtores intermediários ( $A_{595} = 0.532$  a  $0.763$ ), fortes produtores ( $A_{595} = 0.764$ – $0.999$ ) e fortemente produtores ( $A_{595} \geq 1.0$ ) (Montoya *et al.*, 2017).

#### **4.3.6 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS**

##### **4.3.6.1 Células Planctônicas**

##### **4.3.6.1.1 Microdiluição em Caldo**

A verificação de susceptibilidade aos antifúngicos por meio da técnica de microdiluição em caldo foi realizada no Instituto Adolfo Lutz Central, São Paulo-SP, de acordo com a metodologia preconizada no documento EDef 7.3 do EUCAST (Arendrup *et al.*, 2015). Os antifúngicos utilizados na pesquisa foram fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina-B e caspofungina.

Para cada antifúngico foi preparada uma microplaca de poliestireno, onde as soluções de trabalho foram confeccionadas por meio de diluições seriadas de cada fármaco em meio RPMI 1640 estéril, com acréscimo de glicose a 2% e tamponamento com MOPS pH 7,0, até

que fosse obtido uma concentração duas vezes superior à concentração final almejada para as análises de susceptibilidade. A concentração dos antifúngicos foi de 0,008 a 4 mg/L para anfotericina B, caspofungina, itraconazol e voriconazol, e de 0,125 a 64 mg/L para fluconazol.

As leveduras foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose por 24 a 48 horas antes do teste. Após o crescimento, foi preparado um inóculo fúngico com 5 colônias, representativas e distintas, em 3 mL de água destilada. A suspensão foi homogeneizada em agitador com velocidade de 2000 rpm durante 15 segundos, e em seguida a turbidez da suspensão foi ajustada a escala 0,5 de *MacFarland*, correspondendo a uma suspensão de leveduras de  $1-5 \times 10^6$  CFU/mL. Foi, então, preparada uma suspensão de trabalho com diluição de 1:10 da suspensão padrão de  $1-5 \times 10^6$  CFU/mL.

Visando manter a concentração de células viáveis, as placas de microdiluição foram inoculadas dentro de 30 minutos após a preparação do inóculo. Um volume de 100 µL da suspensão de leveduras foi inoculado em cada poço da placa. A coluna 11 foi utilizada para verificação do controle de crescimento, nestes poços foram adicionados 100 µL de meio estéril livre de antifúngico e 100 µL da mesma suspensão do inóculo. A coluna 12 foi utilizada para verificação do controle de esterilidade do meio e água utilizados para o teste. Logo foram adicionados em cada poço 100 µL do meio de cultura e a mesma quantidade de água estéril do lote usado para o preparo do inóculo. Em seguida as placas foram incubadas, sem agitação, durante um período de  $24 \pm 2$  horas à 35°C. A leitura das placas de microdiluição foi realizada em um leitor de placas com absorvância estabelecida de 530 nm. Os valores obtidos dos controles negativos foram subtraídos das leituras dos outros poços. Para anfotericina B, a CIM foi a menor concentração que levou a inibição  $\geq 90$  % de crescimento quando comparado com controle de crescimento livre de antifúngico. Para os azólicos e equinocandinas a concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração que levou à inibição  $\geq 50$  % de crescimento quando comparado com controle de crescimento livre de antifúngico (Arendrup *et al*, 2015).

#### 4.3.6.1.2 Etest

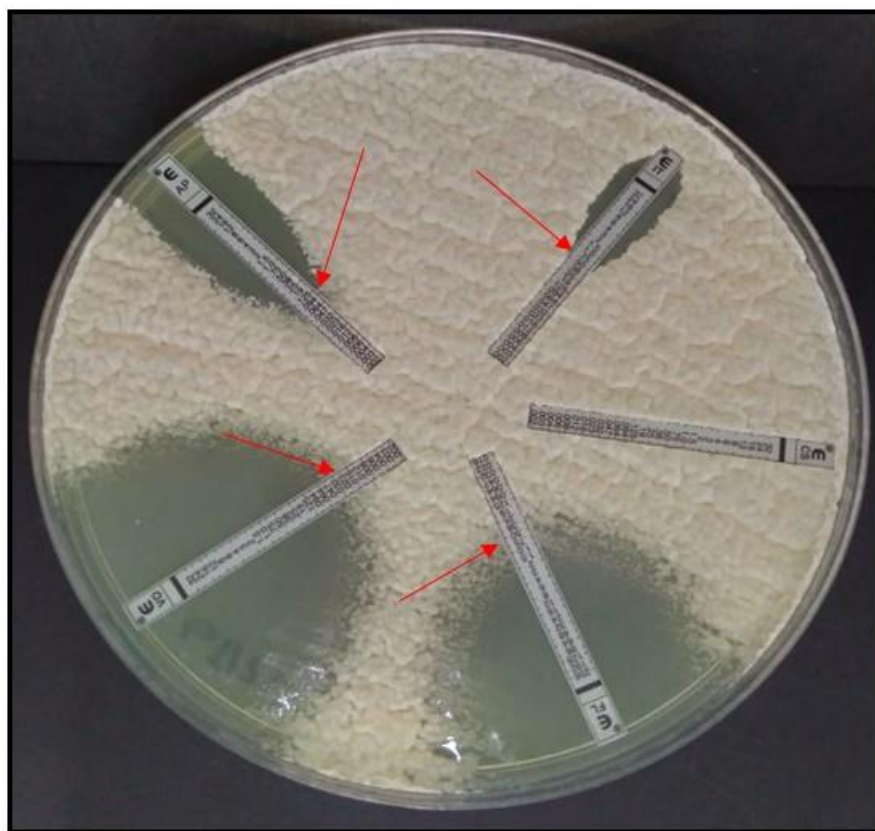
Todas as leveduras foram estudadas frente aos cinco antifúngicos, para o estabelecimento da CIM, por meio do método Etest, um teste comercial de sensibilidade a antifúngicos.

O Etest consiste em fitas plásticas com um gradiente definido e contínuo de antifúngico. Cada fita contém um gradiente de concentração correspondente a 0,016 a 256 µg/mL para

fluconazol e 0,002 a 32  $\mu\text{g/mL}$  para itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B. As fitas de Etest foram armazenadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas.

As leveduras foram previamente cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , e a partir destes cultivos, foram feitas suspensões em salina estéril de acordo com a escala 0,5 de *MacFarland*. O inóculo foi semeado com auxílio de swab alginatado sobre a superfície do ágar *Mueller-Hinton* contido em placas de Petri. As fitas foram dispostas cuidadosamente no centro da placa, sobre a superfície do ágar.

As placas foram então incubadas durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como a concentração que estava no ponto em que o limite da área de inibição do crescimento da levedura interceptava a fita de Etest, conforme pode ser observado na Figura 04.



**Figura 04:** Placa com meio ágar *Mueller-Hinton* e tiras de Etest após incubação para verificação da susceptibilidade antifúngica. Setas Vermelhas demonstram o ponto de interseção entre o crescimento fúngico e a tira de Etest.

#### 4.3.6.2 Biofilmes

A verificação do perfil de sensibilidade dos biofilmes foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Di Bonaventura *et al.* (2006), com algumas modificações. Os antifúngicos utilizados na pesquisa foram fluconazol, com concentração de 0,125 a 64 mg/L e itraconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina com concentrações de 0,008 a 4 mg/L.

As leveduras foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas antes do teste. A partir do crescimento obtido foi preparado um inóculo padronizado com 5 mL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS em pH 7,0 com turbidez compatível a escala 0,5 de *MacFarland* (1x10<sup>6</sup>). Foram transferidas alíquotas de 200µL do inóculo para as placas de poliestireno em duplicata, as quais foram incubadas a 35°C durante 6 horas, visando a adesão das células ao substrato. A coluna 11 das placas foi utilizada para verificação do controle de crescimento, sendo que nestes poços foram adicionados 100 µL de meio estéril livre de antifúngico e 100 µL da mesma suspensão do inóculo. A coluna 12 foi utilizada para verificação do controle de esterilidade do meio e água utilizada para o teste.

Após o período de incubação, as placas foram aspiradas com o auxílio de uma micropipeta e cada poço foi lavado com *Phosphate Buffer Solution* (PBS) acrescido de Tween 20%. Após a lavagem foram adicionados em cada poço 100µL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS estéril e novamente direcionados para incubação a 35°C durante um período de 48 horas.

Após a incubação o sobrenadante contido nos poços foi removido e duas novas lavagens com PBS Tween 20% foram realizadas. Em seguida foram adicionados em cada poço 200µL do meio RPMI previamente preparado com os antifúngicos em concentrações que variam de acordo com o antifúngico de escolha. As placas foram novamente incubadas, por 24 horas para caspofungina e por 48 horas para fluconazol, voriconazol, itraconazol e a anfotericina B. Após a incubação, os sobrenadantes de cultivo dos biofilmes foram aspirados e desprezados e os poços foram lavados com PBS Tween 20% visando a remoção de células não aderidas. Após a lavagem todo o PBS foi cuidadosamente retirado.

Em abrigo de luz direta foi adicionado 50 µL de PBS estéril, 75 µL da solução XTT estéril (1mg/mL em PBS – Sigma) e 6 µL de solução de menadiona (1 mM em acetona – Sigma) em cada poço. Em seguida as placas foram incubadas durante 5 horas à 35°C. Após o período estabelecido de incubação, a solução de XTT foi retirada e transferida para novos poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm, sendo considerado a concentração inibitória mínima em biofilme para caspofungina e azólicos a menor concentração capaz de

diminuir 50% da atividade metabólica dos biofilmes em comparação ao controle sem antifúngico, enquanto para a anfotericina B a concentração inibitória mínima considerada foi aquela capaz de inibir 90% da atividade metabólica dos biofilmes.

#### **4.3.6.3 Interpretação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs)**

Apesar do aumento de infecções causadas por *Trichosporon* spp., até o momento não existem *breakpoints* formalmente propostos para o gênero, o que impede sua classificação com relação a sua sensibilidade ou resistência aos antifúngicos estudados.

### **4.3.7 DIVERSIDADE GENOTÍPICA**

#### **4.3.7.1 Genotipagem e análise filogenética de *T. asahii***

A genotipagem dos isolados foi realizada com as amostras de *T. asahii*, e para tal as sequências IGS1 de *T. asahii* obtidas neste estudo foram comparadas com sequências de DNA depositadas no *GenBank* dos 15 genótipos já descritos em literatura.

Para a análise filogenética das amostras de *T. asahii* foram comparados os dados obtidos por meio do sequenciamento da região IGS1 do rDNA. Esta análise envolveu 32 sequências de nucleotídeos, com total de 551 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no *software* MEGA X. Sequência de DNA de cepa referência de *Trichosporon faecale* CBS 4828 (KM488293) foi utilizada como grupo externo para as análises filogenéticas.

### **4.3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A quantificação do biofilme para cada isolado foi realizada em triplicata, as médias obtidas foram comparadas por meio do teste *Shapiro-Wilk*. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

Os resultados obtidos de fatores de virulência e produção de biofilmes foram comparados entre as amostras humanas, animais e ambientais com os testes de Qui-Quadrado e *Kruskal Wallis* respectivamente. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.



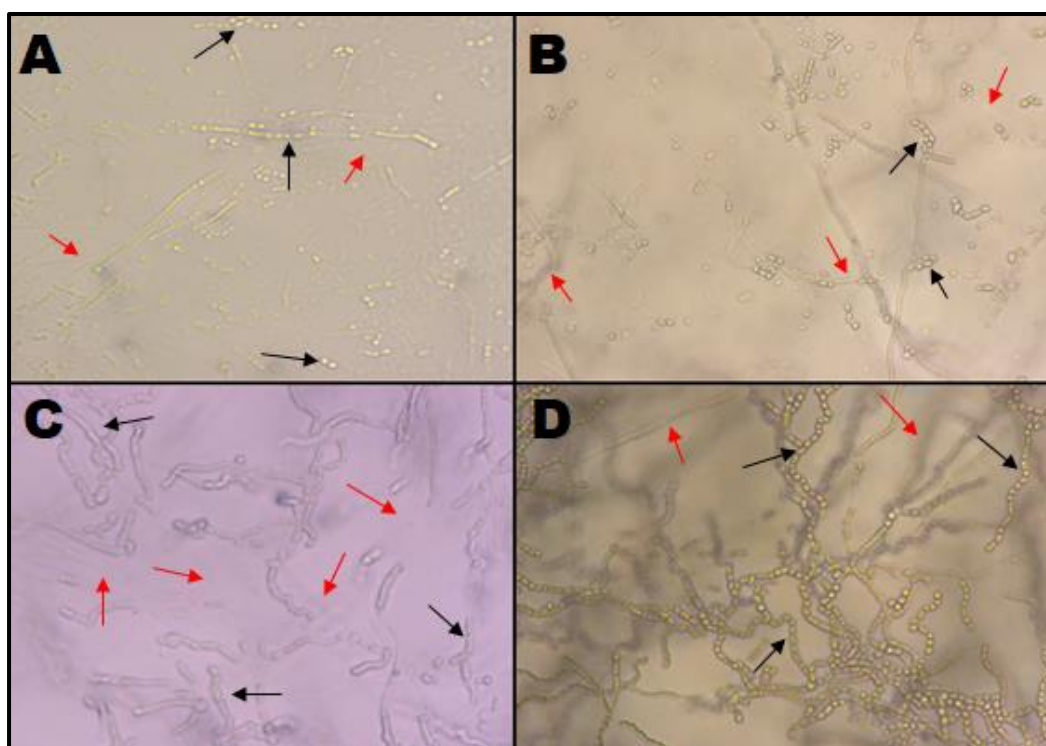
*Resultados*

## 5. RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *Trichosporon* spp.

O meio cromogênico CHROMagar *Candida*® foi utilizado na triagem das amostras para avaliação da pureza e viabilidade das mesmas. Também foi avaliado o comportamento cromogênico das leveduras quando semeadas em meio diferencial e nenhum padrão específico na expressão fenotípica dos isolados foi observada, sendo que 12 colorações diferentes foram expressas pelos isolados de *Trichosporon* frente à assimilação dos cromógenos presentes no meio (Anexo 01).

Na observação microscópica em Corn Meal ágar, todos os isolados apresentaram blastoconídios, hifas, pseudo-hifas e artroconídios. Nenhum isolado apresentou células apresorias, que correspondem a modificações morfológicas em segmentos terminais ou intercalares nas hifas e que ocorrem em algumas espécies do gênero (Figura 05).



**Figura 05:** Características micromorfológicas dos isolados de *Trichosporon* spp. Setas pretas – Artroconídios; Setas vermelhas – Pseudohifas; A – Leitura 7 dias; B, C e D – Leitura 15 dias.

Todas as amostras foram caracterizadas como urease positiva, tolerantes a cicloheximida 0,1% e apresentaram capacidade de crescimento em temperatura de 37°C (Anexo 02). Nenhuma das 59 amostras fermentaram carboidratos (Anexo 03). Todos os dados obtidos nos estudos fenotípicos foram analisados por meio das chaves taxonômicas, e um total de 100% das amostras foram identificadas até o nível de espécie (Anexo 04).

A técnica de espectrometria MALDI-TOF identificou 74,5% (44/59) das amostras como leveduras do gênero *Trichosporon*, sendo que 25,5% (15/59) dos isolados não puderam ser identificados (Anexo 04).

A caracterização molecular, por meio da amplificação e sequenciamento da região IGS1, foi realizada como técnica padrão-ouro na identificação dos isolados de *Trichosporon* spp. Do total de amostras estudadas, a espécie que apresentou maior frequência foi *T. asahii* (52,6% - 31/59), seguida por *T. debeurmannianum* (18,6% - 11/59), *T. inkin* (13,5% - 08/59) e *T. dermatitis* (5,1% - 03/59) (Tabela 03 e Anexo 04). Entre as amostras isoladas de material humano a espécie mais frequente foi *T. asahii* (68,5% - 30/44) e nos isolados ambientais *T. debeurmannianum* (100% - 11/11). Entre as 04 cepas de origem animal, espécies distintas foram identificadas (Tabela 04).

**Tabela 03** – Frequência das espécies entre as 59 amostras de *Trichosporon* identificadas por meio da amplificação e sequenciamento da região IGS1.

| Espécie                   | Isolados Identificados |
|---------------------------|------------------------|
|                           | % (N)                  |
| <i>T. asahii</i>          | 52,6(31)               |
| <i>T. debeurmannianum</i> | 18,6 (11)              |
| <i>T. inkin</i>           | 13,5 (08)              |
| <i>T. dermatitis</i>      | 5,1 (03)               |
| <i>T. coremiiforme</i>    | 3,4 (02)               |
| <i>T. montevidense</i>    | 1,7 (01)               |
| <i>T. veenhuisii</i>      | 1,7 (01)               |
| <i>T. insectorum</i>      | 1,7 (01)               |
| <i>Trichosporon</i> spp.  | 1,7 (0,1)              |
| <b>TOTAL</b>              | <b>100 (59)</b>        |

**Tabela 04** - Frequência das espécies de *Trichosporon* distribuídas de acordo com a origem dos isolados (humana, animal e ambiental) e identificadas por meio da amplificação e sequenciamento da região IGS1.

| Origem/Espécie            | Isolados Identificados |
|---------------------------|------------------------|
|                           | % (N)                  |
| <b>Humanas (n=44)</b>     |                        |
| <i>T. asahii</i>          | 68,5 (30)              |
| <i>T. inkin</i>           | 18,1 (08)              |
| <i>T. dermatis</i>        | 6,8 (03)               |
| <i>T. coremiiforme</i>    | 2,2 (01)               |
| <i>T. montevidense</i>    | 2,2 (01)               |
| <i>T. veenhuisii</i>      | 2,2 (01)               |
| <b>Animal (n=04)</b>      |                        |
| <i>T. asahii</i>          | 25,0 (01)              |
| <i>T. coremiiforme</i>    | 25,0 (01)              |
| <i>T. insectorum</i>      | 25,0 (01)              |
| <i>Trichosporon</i> spp.  | 25,0 (01)              |
| <b>Ambiental (n=11)</b>   |                        |
| <i>T. debeurmannianum</i> | 100 (11)               |

O nível de concordância entre a metodologia fenotípica tradicional e a técnica molecular, na identificação das 59 amostras de *Trichosporon*, foi de 55.9% (34/59). A concordância na identificação entre MALDI-TOF MS e a técnica molecular foi de 67.8% (40/59). Quando comparadas as técnicas de MALDI-TOF MS e fenotípica tradicional, a concordância foi de 59,3% (35/59). A espécie que obteve maior concordância nas identificações foi *T. asahii*, sendo 100% quando comparada a técnica molecular com a fenotípica tradicional, 93,5% (29/31) quando comparada a metodologia molecular com MALDI-TOF MS e 93,5% (29/31) quando comparado a metodologia fenotípica com MALDI-TOF MS conforme pode ser observado na Tabela 05.

**Tabela 05** – Comparação da identificação de 59 amostras de *Trichosporon* spp. por sequenciamento da região IGS1, método fenotípico tradicional e MALDI-TOF MS

| Espécies                  | Sequenciamento<br>da região IGS1 | Método<br>Fenotípica | MALDI-TOF MS |
|---------------------------|----------------------------------|----------------------|--------------|
|                           | N                                | N                    | N            |
| <i>T. asahii</i>          | 31                               | 31                   | 29           |
| <i>T. debeurmannianum</i> | 11                               | 0                    | 0            |
| <i>T. inkin</i>           | 8                                | 1                    | 9            |
| <i>T. dermatis</i>        | 3                                | 0                    | 0            |
| <i>T. coremiiforme</i>    | 2                                | 1                    | 2            |
| <i>T. montevidense</i>    | 1                                | 1                    | 1            |
| <i>T. veenhuisii</i>      | 1                                | 0                    | 0            |
| <i>T. faecale</i>         | 0                                | 1                    | 0            |
| <i>T. japonicum</i>       | 0                                | 10                   | 0            |
| <i>T. mucoides</i>        | 0                                | 14                   | 3            |
| <i>T. insectorum</i>      | 1                                | 0                    | 0            |
| <i>Trichosporon</i> spp   | 1                                | 0                    | 0            |
| Sem identificação         | 0                                | 0                    | 15           |
| <b>TOTAL</b>              | <b>59</b>                        | <b>59</b>            | <b>59</b>    |

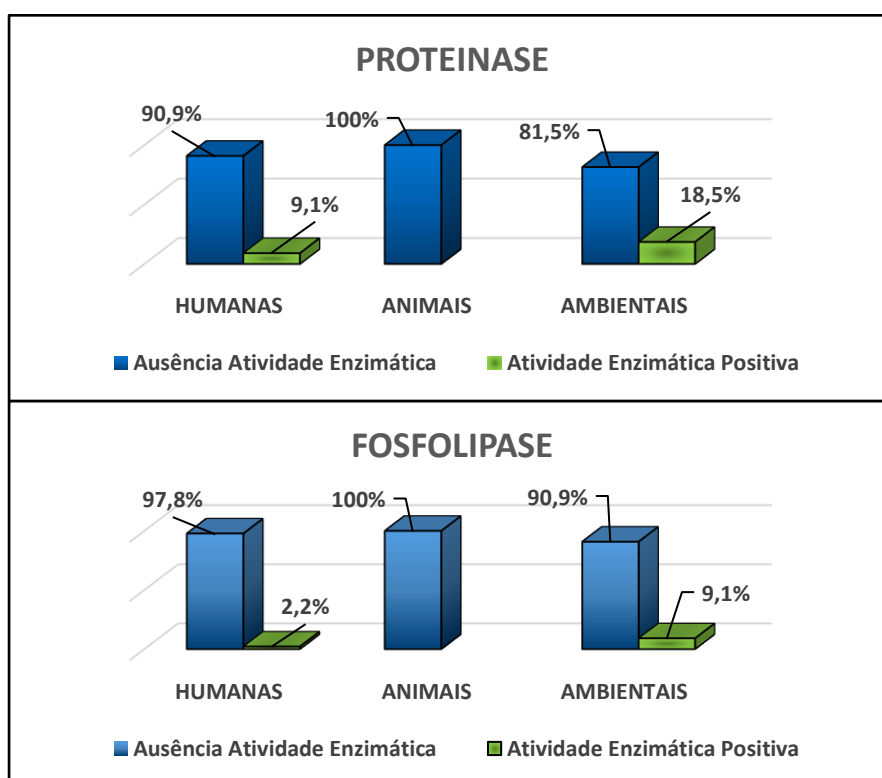
## 5.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Neste estudo foi verificado que 89,8% e 96,6% dos isolados não apresentaram atividade para as enzimas proteinase e fosfolipase, respectivamente (Tabela 06). As amostras humanas, animais e ambientais, predominantemente, não apresentaram atividade enzimática (Figura 06). As únicas amostras que apresentaram secreção das enzimas proteinase foram: 01 amostra de *T. asahii*, 03 de *T. dermatis* e 02 de *T. debeurmannianum*. Em relação à enzima fosfolipase, 01 amostra de *T. asahii* apresentou atividade e 01 de *T. debeurmannianum*. A análise estatística da produção das enzimas proteinase e fosfolipase comparando entre os grupos de origem humana, ambiental e animal foi realizada pelo método qui-quadrado, sendo que valor obtido de P foi 0,5627 e 0,5223, respectivamente, ou seja, ambos não possuem significância estatística, uma vez que foi estabelecido como referência o valor de  $P < 0,05$ .

**Tabela 06** – Atividade das enzimas proteinase e fosfolipase apresentada pelas 59 amostras de *Trichosporon* spp. estudadas.

| Espécies                  | Índice de Atividade Enzimática (Pz) |                  |                |                 |          |          |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------|----------------|-----------------|----------|----------|
|                           | 1                                   |                  | 2              |                 | 3        |          |
|                           | n (%)                               |                  | n (%)          |                 | n (%)    |          |
|                           | AF                                  | AP               | AF             | AP              | AF       | AP       |
| <i>T. asahii</i>          | 30 (52,7)                           | 30 (56,7)        | 1 (50)         | 1 (16,7)        | -        | -        |
| <i>T. debeurmannianum</i> | 10 (17,5)                           | 9 (16,9)         | 1 (50)         | 2 (33,3)        | -        | -        |
| <i>T. inkin</i>           | 8 (14,3)                            | 8 (15,1)         | -              | -               | -        | -        |
| <i>T. dermatis</i>        | 3 (5,2)                             | -                | -              | 3 (50)          | -        | -        |
| <i>T. coremiiforme</i>    | 2 (3,5)                             | 2 (3,7)          | -              | -               | -        | -        |
| <i>T. montevidense</i>    | 1 (1,7)                             | 1 (1,9)          | -              | -               | -        | -        |
| <i>T. veenhuisii</i>      | 1 (1,7)                             | 1 (1,9)          | -              | -               | -        | -        |
| <i>T. insectorum</i>      | 1 (1,7)                             | 1 (1,9)          | -              | -               | -        | -        |
| <i>Trichosporon</i> spp.  | 1 (1,7)                             | 1 (1,9)          | -              | -               | -        | -        |
| <b>TOTAL</b>              | <b>57 (96,6)</b>                    | <b>53 (89,8)</b> | <b>2 (3,4)</b> | <b>6 (10,2)</b> | <b>0</b> | <b>0</b> |

AF = atividade fosfolipásica; AP = atividade proteolítica; Pz = Valores da atividade enzimática, segundo Price *et al* (1982): Pz = 1 ausência de atividade enzimática = índice 1;  $1,0 < Pz \leq 0,64$  atividade enzimática positiva = índice 2;  $Pz < 0,64$  atividade enzimática fortemente positiva = índice 3.

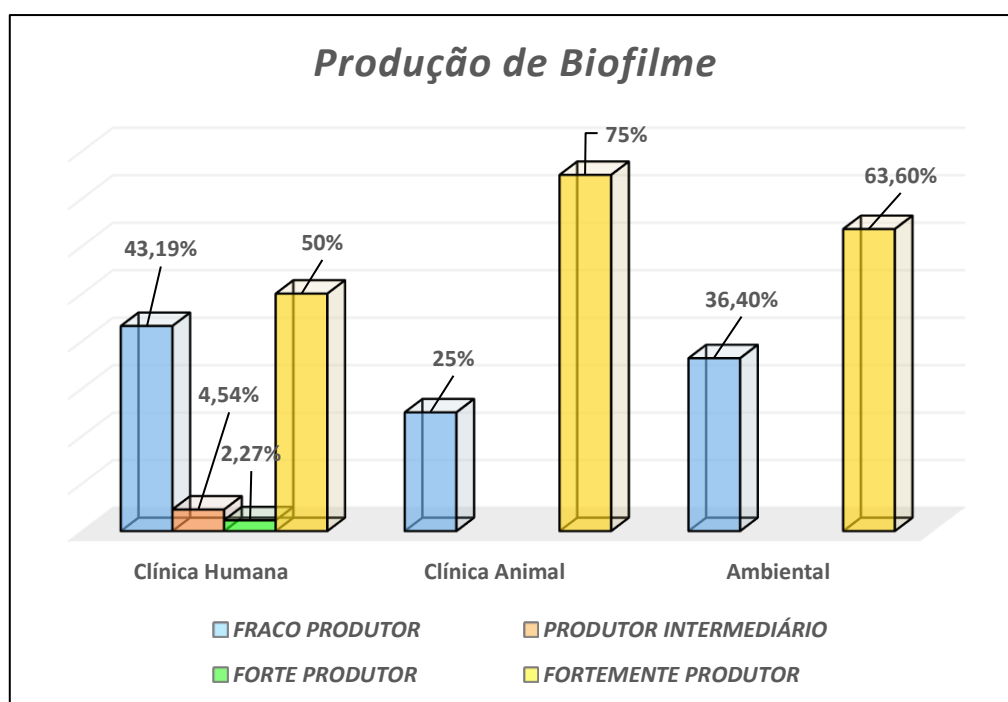


**Figura 06** - Atividade das enzimas proteinase e fosfolipase das amostras de *Trichosporon* spp. distribuídas entre os grupos de origem humana, ambiental e animal.

A habilidade de formar biofilme sob a superfície de placas de poliestireno foi observada em 100% dos isolados, sendo que 54,3% (32/59) das amostras foram consideradas como fortemente produtoras (Tabela 07). Comparando entre os grupos de origem humana, animal e ambiental a maioria dos isolados foi classificado como fortemente produtor, com valores de 50%, 75% e 63,6%, respectivamente (Figura 07). Entre as espécies, *T. asahii* apresentou o maior número de isolados na classificação fortemente positivo (14/32).

**Tabela 07** – Produção de biofilme distribuída de acordo com a espécie de *Trichosporon*.

| Espécies                  | Absorbância (nm)<br>Média (mínimo-<br>máximo) | Classificação (n)      |                   |                           |                   |
|---------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
|                           |                                               | Fortemente<br>Produtor | Forte<br>Produtor | Intermediário<br>Produtor | Fraco<br>Produtor |
| <i>T. asahii</i>          | 0,971 (0,005-3,800)                           | 14                     | 01                | 02                        | 14                |
| <i>T. debeurmannianum</i> | 1,814 (0,008-3,350)                           | 07                     | 0                 | 0                         | 04                |
| <i>T. inkin</i>           | 2,002 (0,316-2,913)                           | 07                     | 0                 | 0                         | 01                |
| <i>T. dermatis</i>        | 0,804 (0,353-1,637)                           | 01                     | 0                 | 0                         | 02                |
| <i>T. coremiiforme</i>    | 1,149 (0,061-2,237)                           | 01                     | 0                 | 0                         | 01                |
| <i>T. montevidense</i>    | 3,812                                         | 01                     | 0                 | 0                         | 0                 |
| <i>T. veenhuisii</i>      | 0,278                                         | 0                      | 0                 | 0                         | 01                |
| <i>T. insectorum</i>      | 1,790                                         | 01                     | 0                 | 0                         | 0                 |
| <i>Trichosporon</i> spp   | 0,029                                         | 0                      | 0                 | 0                         | 1                 |
| <b>TOTAL</b>              | 1,330 (0,005-3,812)                           | 32 (54,3%)             | 01 (1,7%)         | 02 (3,3%)                 | 24 (40,7%)        |



**Figura 07** - Caracterização, em relação a formação de biofilme, das amostras de *Trichosporon* spp. distribuídas entre os grupos de origem humana, ambiental e animal.

A análise estatística da produção de biofilme entre os grupos de origem humana, ambiental e animal foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* com o valor de significância estabelecido em  $P < 0,05$ , entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos analisados (Tabela 08).

**Tabela 08** - Produção de biofilme dos isolados de *Trichosporon* spp. distribuídos entre os grupos de origem humana, ambiental e animal.

| Origem    | Absorbância (nm)      |          |
|-----------|-----------------------|----------|
|           | Média (mínima-máxima) | Valor-p* |
| Humana    | 1,223 (0,005-3,812)   | 0,410    |
| Ambiental | 1,734 (0,008-3,350)   |          |
| Animal    | 1,446 (0,029-2,237)   |          |

\* Teste de *Kruskal-Wallis*

### 5.3 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

#### 5.3.1. Células Planctônicas

As Tabelas 09 e 10 mostram os intervalos de CIM e as CIMs que inibiram 50% e 90% das amostras (CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>), com os dois métodos estudados e distribuídos de acordo com a origem da amostra (humana, ambiental, animal). De um modo geral, independente da origem da amostra, em ambos os métodos foram observadas CIMs elevadas para os antifúngicos fluconazol e caspofungina, sendo que para algumas espécies a anfotericina B e o itraconazol também apresentaram valores elevados. Voriconazol apresentou os menores valores de CIM para as amostras humanas e animais em ambas as metodologias estudadas e para as amostras ambientais na metodologia de microdiluição em caldo. Quando as amostras ambientais foram testadas frente ao método comercial Etest, foi observado valores menos elevados de CIM frente ao antifúngico anfotericina B.

Para o método Etest, independente da origem da amostra, foram observados valores maiores de CIMs para os antifúngicos caspofungina, fluconazol e itraconazol. Na técnica de microdiluição em caldo as amostras humanas e ambientais apresentaram menor susceptibilidade frente a caspofungina, anfotericina B e fluconazol, enquanto as amostras animais, seguiram o mesmo padrão observado no método comercial Etest, expondo maiores resultados de CIMs para os antifúngicos caspofungina, itraconazol e fluconazol.



Comparando os valores de CIMs entre os dois métodos, no Etest os antifúngicos fluconazol, caspofungina e itraconazol apresentaram intervalos de CIMs bem amplos em relação àqueles observados para o EUCAST, com valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> maiores e discrepantes. Discrepâncias menores foram observadas nos antifúngicos anfotericina B e voriconazol, sendo que, para a anfotericina B foram observados valores menores de CIMs pelo método Etest. A falta de *breakpoints* formalmente propostos para o gênero, impediu a classificação com relação a sua sensibilidade ou resistência.

Todas as espécies apresentaram elevados valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> frente ao fluconazol e caspofungina em ambos os métodos. Vale ressaltar que *T. asahii* e as amostras ambientais representadas por *T. debeurmannianum* apresentaram valores bem maiores de CIM frente ao fluconazol utilizando o método Etest. *Trichosporon asahii* também apresentou valores maiores frente à anfotericina B (Tabela 11). As demais espécies demonstraram valores variados de CIMs.

**Tabela 09:** CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> dos 59 isolados de *Trichosporon* spp. frente a cinco antifúngicos por meio do método de microdiluição EUCAST.

| Fármacos<br>Antifúngicos | Humanas       |                           |                           | Animais       |                           |                           | Ambientais    |                           |                           |
|--------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|
|                          | Range<br>mg/L | CIM <sub>50</sub><br>mg/L | CIM <sub>90</sub><br>mg/L | Range<br>mg/L | CIM <sub>50</sub><br>mg/L | CIM <sub>90</sub><br>mg/L | Range<br>mg/L | CIM <sub>50</sub><br>mg/L | CIM <sub>90</sub><br>mg/L |
| <b>Fluconazol</b>        | 0,25 – 32     | 2,285                     | 7,2                       | 0,5 – 2       | 1                         | 1,8                       | 0,25 – 8      | 0,85                      | 3,8                       |
| <b>Itraconazol</b>       | 0,015 – 0,5   | 0,112                     | 0,362                     | 0,03 – 0,25   | 0,06                      | 0,198                     | 0,015 – 0,5   | 0,133                     | 0,247                     |
| <b>Voriconazol</b>       | 0,015 – 0,5   | 0,033                     | 0,114                     | 0,03 – 0,06   | 0,04                      | 0,056                     | 0,015 – 0,25  | 0,07                      | 0,202                     |
| <b>Anfotericina-B</b>    | 0,06 – 4      | 0,538                     | 1,933                     | 1             | N.D                       | N.D                       | 0,5 – 1       | N.D                       | 0,816                     |
| <b>Caspofungina</b>      | 0,03 – 4      | 0,973                     | 3,022                     | 2 – 4         | N.D                       | 3,2                       | 2 – 4         | 2,625                     | 3,725                     |

N.D – Valores de CIM não definidos

**Tabela 10 -** CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> dos 59 isolados de *Trichosporon* spp. frente a cinco antifúngicos por meio do método comercial “Etest”.

| Fármacos<br>Antifúngicos | Clínicas Humanas |                            |                            | Clínicas Animais |                            |                            | Ambientais     |                            |                            |
|--------------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|
|                          | Range<br>µg/ml   | CIM <sub>50</sub><br>µg/ml | CIM <sub>90</sub><br>µg/ml | Range<br>µg/ml   | CIM <sub>50</sub><br>µg/ml | CIM <sub>90</sub><br>µg/ml | Range<br>µg/ml | CIM <sub>50</sub><br>µg/ml | CIM <sub>90</sub><br>µg/ml |
| <b>Fluconazol</b>        | 3 – 256          | 12,666                     | 185,6                      | 2 – 24           | 2                          | 16,8                       | 4 – 256        | 9                          | 23,2                       |
| <b>Itraconazol</b>       | 0,38 – 32        | 2,75                       | 14,4                       | 2 – >32          | 2                          | 20,8                       | 0,094 – 2      | 0,875                      | 1,725                      |
| <b>Voriconazol</b>       | 0,004 – 3        | 0,131                      | 0,371                      | 0,023 – 0,19     | 0,058                      | 0,151                      | 0,064 – 0,75   | 0,17                       | 0,367                      |
| <b>Anfotericina-B</b>    | 0,019 – 8        | 0,38                       | 1,266                      | 0,064 – 0,5      | 0,064                      | 0,376                      | 0,003 – 0,38   | 0,007                      | 0,275                      |
| <b>Caspofungina</b>      | 0,094 – 32       | 15,287                     | 28,657                     | 32               | 32                         | 32                         | 0,25 – 32      | 14,537                     | 28,507                     |

**Tabela 11** - Valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> das espécies de *Trichosporon*, frente a cinco antifúngicos estudadas por meio do método de microdiluição em caldo EUCAST e Etest.

| Espécies (nº de isolados e fármacos antifúngicos) | Eucast       |                   |                   | Etest         |                   |                   |
|---------------------------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------------|-------------------|
|                                                   | Range        | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | Range         | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| <b><i>T. asahii</i> (n=31)</b>                    |              |                   |                   |               |                   |                   |
| Fluconazol                                        | 0,5 – 32     | 2,454             | 25,4              | 3 – 256       | 17,333            | 206,4             |
| Itraconazol                                       | 0,015 – 0,5  | 0,105             | 0,306             | 1 – 32        | 3,1               | 15,6              |
| Voriconazol                                       | 0,015 – 0,5  | 0,012             | 0,118             | 0,004 – 1,5   | 0,153             | 0,377             |
| Anfotericina B                                    | 0,12 – 4     | 0,694             | 2,45              | 0,019 – 8     | 0,464             | 1,483             |
| Caspofungina                                      | 0,03 – 4     | 0,98              | 3,38              | 0,094 – 32    | 14,946            | 28,589            |
| <b><i>T. debeurmannianum</i> (n=11)</b>           |              |                   |                   |               |                   |                   |
| Fluconazol                                        | 0,25 – 8     | 0,85              | 3,8               | 4 – 256       | 8,5               | 23,2              |
| Itraconazol                                       | 0,015 – 0,5  | 0,113             | 0,247             | 0,094 – 3     | 0,875             | 1,975             |
| Voriconazol                                       | 0,015 – 0,25 | 0,07              | 0,202             | 0,064 – 0,75  | 0,170             | 0,367             |
| Anfotericina B                                    | 0,5 – 1      | N.D.              | 1,45              | 0,003 – 0,38  | 0,007             | 0,275             |
| Caspofungina                                      | 2 – 4        | 2,625             | 3,725             | 0,25 – 32     | 14,501            | 28,534            |
| <b><i>T. inkin</i> (n=8)</b>                      |              |                   |                   |               |                   |                   |
| Fluconazol                                        | 0,25 – 8     | 1                 | 4,8               | 4 – 48        | 7                 | 19,2              |
| Itraconazol                                       | 0,015 – 0,25 | 0,03              | 0,198             | 1 – 32        | 2,666             | 20,8              |
| Voriconazol                                       | 0,015 – 0,12 | 0,024             | 0,072             | 0,094 – 0,38  | 0,094             | 0,228             |
| Anfotericina B                                    | 0,06 – 1     | 0,31              | 0,866             | 0,19 – 0,5    | 0,21              | 0,404             |
| Caspofungina                                      | 1 – 2        | 1,333             | 1,866             | 32            | N.D.              | N.D.              |
| <b><i>T. dermatis</i> (n=3)</b>                   |              |                   |                   |               |                   |                   |
| Fluconazol                                        | 2 – 8        | 3                 | 6,8               | 6 – 8         | N.D.              | 7,4               |
| Itraconazol                                       | 0,5          | N.D.              | N.D.              | 0,38 – 1,5    | 0,44              | 1,2               |
| Voriconazol                                       | 0,03 – 0,06  | N.D.              | 0,051             | 0,094 – 0,125 | N.D.              | 0,115             |
| Anfotericina B                                    | 0,06 – 1     | 0,155             | 0,775             | 0,023 – 0,25  | 0,027             | 0,184             |
| Caspofungina                                      | 0,12 – 1     | 0,34              | 0,868             | 32            | N.D.              | N.D.              |
| <b><i>T. coremiiforme</i> (n=2)</b>               |              |                   |                   |               |                   |                   |
| Fluconazol                                        | 2 – 4        | 2                 | 3,6               | 4 – 6         | 4                 | 5,6               |
| Itraconazol                                       | 0,25 – 0,5   | 0,25              | 0,45              | 2             | N.D.              | N.D.              |
| Voriconazol                                       | 0,03 – 0,06  | 0,03              | 0,054             | 0,094 – 0,125 | 0,094             | 0,121             |
| Anfotericina B                                    | 0,06 – 1     | 0,06              | 0,812             | 0,19 – 0,5    | 0,19              | 0,438             |
| Caspofungina                                      | 1 – 2        | 1                 | 1,80              | 32            | N.D.              | N.D.              |
| <b><i>T. montevidense</i> (n=1)</b>               |              |                   |                   |               |                   |                   |
| Fluconazol                                        | 2            | N.D.              | N.D.              | 6             | N.D.              | N.D.              |
| Itraconazol                                       | 0,015        | N.D.              | N.D.              | 1,5           | N.D.              | N.D.              |
| Voriconazol                                       | 0,015        | N.D.              | N.D.              | 0,19          | N.D.              | N.D.              |
| Anfotericina B                                    | 0,12         | N.D.              | N.D.              | 0,75          | N.D.              | N.D.              |
| Caspofungina                                      | 2            | N.D.              | N.D.              | 32            | N.D.              | N.D.              |
| <b><i>T. veenhuisii</i> (n=1)</b>                 |              |                   |                   |               |                   |                   |
| Fluconazol                                        | 16           | N.D.              | N.D.              | 64            | N.D.              | N.D.              |
| Itraconazol                                       | 0,25         | N.D.              | N.D.              | 1,5           | N.D.              | N.D.              |
| Voriconazol                                       | 0,25         | N.D.              | N.D.              | 3             | N.D.              | N.D.              |
| Anfotericina B                                    | 1            | N.D.              | N.D.              | 0,75          | N.D.              | N.D.              |
| Caspofungina                                      | 1            | N.D.              | N.D.              | 32            | N.D.              | N.D.              |
| <b><i>T. insectorum</i> (n=1)</b>                 |              |                   |                   |               |                   |                   |
| Fluconazol                                        | 2            | N.D.              | N.D.              | 2             | N.D.              | N.D.              |
| Itraconazol                                       | 0,06         | N.D.              | N.D.              | 2             | N.D.              | N.D.              |
| Voriconazol                                       | 0,06         | N.D.              | N.D.              | 0,023         | N.D.              | N.D.              |
| Anfotericina B                                    | 1            | N.D.              | N.D.              | 0,064         | N.D.              | N.D.              |
| Caspofungina                                      | 2            | N.D.              | N.D.              | 32            | N.D.              | N.D.              |
| <b><i>Trichosporon</i> spp. (n=1)</b>             |              |                   |                   |               |                   |                   |
| Fluconazol                                        | 1            | N.D.              | N.D.              | 2             | N.D.              | N.D.              |
| Itraconazol                                       | 0,12         | N.D.              | N.D.              | 4             | N.D.              | N.D.              |
| Voriconazol                                       | 0,06         | N.D.              | N.D.              | 0,094         | N.D.              | N.D.              |
| Anfotericina B                                    | 1            | N.D.              | N.D.              | 0,064         | N.D.              | N.D.              |
| Caspofungina                                      | 2            | N.D.              | N.D.              | 32            | N.D.              | N.D.              |

N.D – Valores de CIM não definidos

### 5.3.2. Biofilmes

A Tabela 12 apresenta o perfil de sensibilidade dos biofilmes, demonstrando as CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> das amostras de acordo com a sua origem (humana, ambiental, animal). De um modo geral, independente da origem da amostra, foram observadas CIMs elevadas para todos os antifúngicos testados, sendo eles, fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina. Entre os azóis foram encontradas concentrações de 2 a 32 vezes maiores que aquelas observadas para células planctônicas utilizando o método EUCAST, sendo que destes, as maiores variações foram observadas para fluconazol e voriconazol. Concentrações de 4 a 66 vezes maiores foram observadas para a anfotericina B e de 2 a 33 vezes maiores para a caspofungina.

**Tabela 12** - CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> dos biofilmes de 59 isolados de *Trichosporon* spp. frente a cinco antifúngicos por meio do método de microdiluição EUCAST.

| Antifúngicos          | Clínicas Humanas |                           |                           | Clínicas Animais |                           |                           | Ambientais    |                           |                           |
|-----------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|
|                       | Range<br>mg/L    | CIM <sub>50</sub><br>mg/L | CIM <sub>90</sub><br>mg/L | Range<br>mg/L    | CIM <sub>50</sub><br>mg/L | CIM <sub>90</sub><br>mg/L | Range<br>mg/L | CIM <sub>50</sub><br>mg/L | CIM <sub>90</sub><br>mg/L |
| <b>Fluconazol</b>     | 0,125 - 64       | 45,57                     | 60,29                     | 64               | N.D                       | N.D                       | 64            | N.D                       | N.D                       |
| <b>Itraconazol</b>    | 0,0625 - 4       | 2,92                      | 3,78                      | 4                | N.D                       | N.D                       | 0,5 - 4       | 2,77                      | 3,75                      |
| <b>Voriconazol</b>    | 0,008 - 4        | 2,87                      | 3,77                      | 1 - 4            | 1                         | 3,4                       | 0,5 - 4       | 2,07                      | 3,61                      |
| <b>Anfotericina-B</b> | 4                | N.D                       | N.D                       | 4                | N.D                       | N.D                       | 4             | N.D                       | N.D                       |
| <b>Caspofungina</b>   | 1 - 4            | 2,47                      | 3,69                      | 4                | N.D                       | N.D                       | 4             | N.D                       | N.D                       |

N.D – Valores de CIM não definidos

Embora os valores de CIM tenham sido elevados, em relação as espécies, *T. coremiiforme* apresentou valores menores de CIM para fluconazol, *T. montevidense* para itraconazol, *T. insectorum* para voriconazol e por fim, a espécie de *T. veenhuisii* apresentou menor susceptibilidade frente ao fluconazol e ao voriconazol (Tabela 13).

**Tabela 13** - CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> dos biofilmes formados pelas espécies de *Trichosporon*, frente a cinco antifúngicos estudados por meio do método de microdiluição em caldo EUCAST.

| Espécies (nº de isolados e drogas antifúngicas) | Eucast - Biofilme |                   |                   |
|-------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                 | Range             | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> |
| <b><i>T. asahii</i> (n=31)</b>                  |                   |                   |                   |
| Fluconazol                                      | 0,5 - 64          | 46,28             | 60,45             |
| Itraconazol                                     | 1 - 4             | 2,45              | 3,69              |
| Voriconazol                                     | 0,008 - 4         | 2,89              | 3,77              |
| Anfotericina B                                  | 4                 | N.D               | N.D               |
| Caspofungina                                    | 1 - 4             | 2,45              | 3,69              |
| <b><i>T. debeurmannianum</i> (n=11)</b>         |                   |                   |                   |
| Fluconazol                                      | 64                | N.D               | N.D               |
| Itraconazol                                     | 0,5 - 4           | 2,77              | 3,75              |
| Voriconazol                                     | 0,5 - 4           | 2,07              | 3,61              |
| Anfotericina B                                  | 4                 | N.D               | N.D               |
| Caspofungina                                    | 4                 | N.D               | N.D               |
| <b><i>T. inkin</i> (n=8)</b>                    |                   |                   |                   |
| Fluconazol                                      | 0,125 - 64        | 27,49             | 56,69             |
| Itraconazol                                     | 4                 | N.D               | N.D               |
| Voriconazol                                     | 1 - 4             | 2,28              | 3,65              |
| Anfotericina B                                  | 4                 | N.D               | N.D               |
| Caspofungina                                    | 4                 | N.D               | N.D               |
| <b><i>T. dermatis</i> (n=3)</b>                 |                   |                   |                   |
| Fluconazol                                      | 0,125 - 64        | 16,08             | 54,70             |
| Itraconazol                                     | 4                 | N.D               | N.D               |
| Voriconazol                                     | 4                 | N.D               | N.D               |
| Anfotericina B                                  | 4                 | N.D               | N.D               |
| Caspofungina                                    | 4                 | N.D               | N.D               |
| <b><i>T. coremiiforme</i> (n=2)</b>             |                   |                   |                   |
| Fluconazol                                      | 4                 | N.D               | N.D               |
| Itraconazol                                     | 4                 | N.D               | N.D               |
| Voriconazol                                     | 1 - 4             | 1                 | 3,4               |
| Anfotericina B                                  | 4                 | N.D               | N.D               |
| Caspofungina                                    | 4                 | N.D               | N.D               |
| <b><i>T. montevidense</i> (n=1)</b>             |                   |                   |                   |
| Fluconazol                                      | 64                | N.D               | N.D               |
| Itraconazol                                     | 0,0625            | N.D               | N.D               |
| Voriconazol                                     | 4                 | N.D               | N.D               |
| Anfotericina B                                  | 4                 | N.D               | N.D               |
| Caspofungina                                    | 4                 | N.D               | N.D               |
| <b><i>T. veenhuisii</i> (n=1)</b>               |                   |                   |                   |
| Fluconazol                                      | 0,125             | N.D               | N.D               |
| Itraconazol                                     | 4                 | N.D               | N.D               |
| Voriconazol                                     | 0,5               | N.D               | N.D               |
| Anfotericina B                                  | 4                 | N.D               | N.D               |
| Caspofungina                                    | 4                 | N.D               | N.D               |
| <b><i>T. insectorum</i> (n=1)</b>               |                   |                   |                   |
| Fluconazol                                      | 64                | N.D               | N.D               |
| Itraconazol                                     | 4                 | N.D               | N.D               |
| Voriconazol                                     | 1                 | N.D               | N.D               |
| Anfotericina B                                  | 4                 | N.D               | N.D               |
| Caspofungina                                    | 4                 | N.D               | N.D               |
| <b><i>Trichosporon</i> spp. (n=1)</b>           |                   |                   |                   |
| Fluconazol                                      | 64                | N.D               | N.D               |
| Itraconazol                                     | 4                 | N.D               | N.D               |
| Voriconazol                                     | 4                 | N.D               | N.D               |
| Anfotericina B                                  | 4                 | N.D               | N.D               |
| Caspofungina                                    | 4                 | N.D               | N.D               |

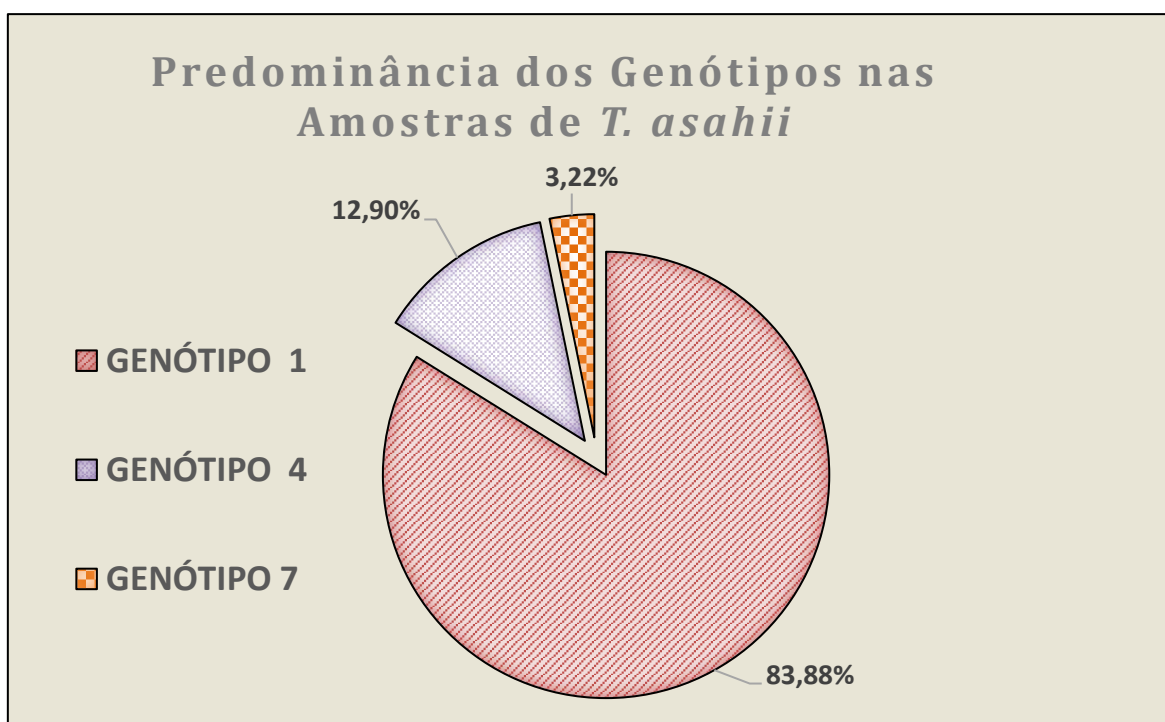
N.D – Valores de CIM não definidos

#### 5.4 DIVERSIDADE GENOTÍPICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA – *T. asahii*

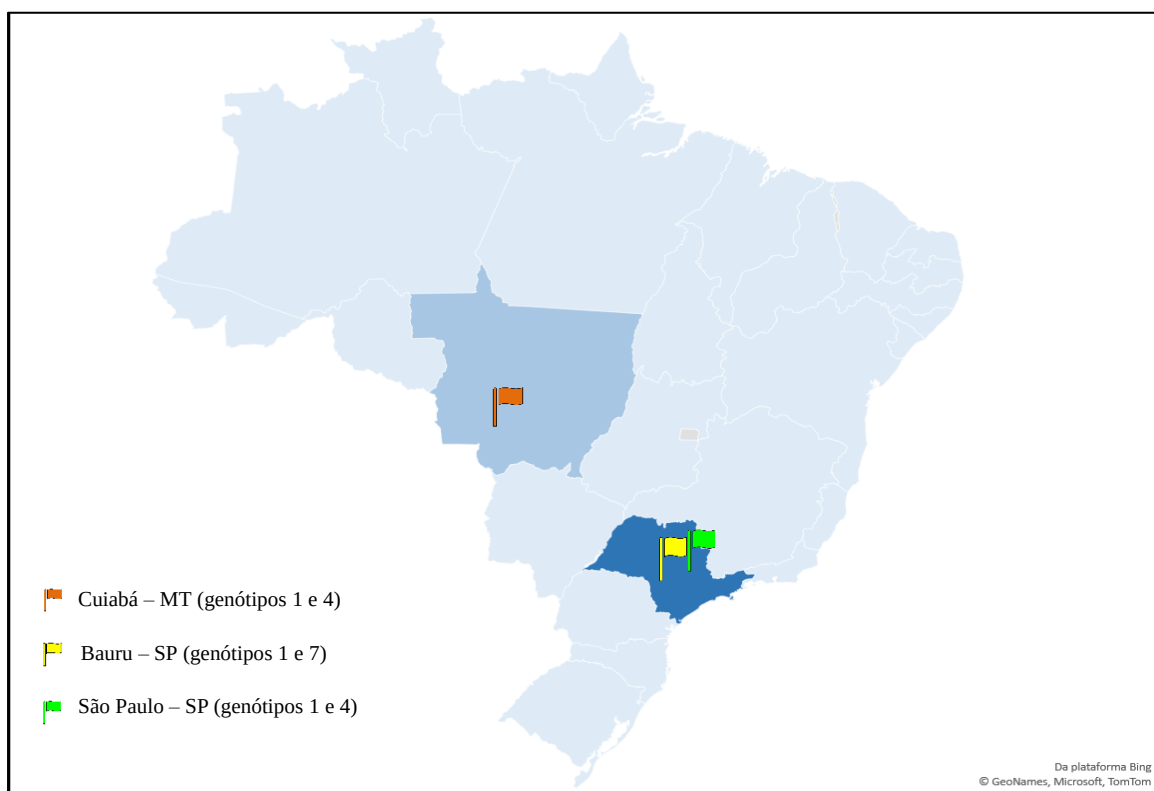
A verificação da diversidade genotípica por sequenciamento da região IGS1 das amostras de *T. asahii* demonstrou a presença de três genótipos (Tabela 14). Foi predominantemente encontrado o genótipo 1 (83,88% - 26/31), seguido pelos genótipos 4 (12,90% - 4/31) e 7 (3,22% - 1/31) (Figura 08). Quanto a localização geográfica, os genótipos 1 e 4 foram isolados em São Paulo-SP e Cuiabá-MT, enquanto entre os isolados da cidade de Bauru-SP foram encontrados genótipos 1 e 7 (Figura 09), não configurando associação de genótipos com região geográfica, uma vez que o genótipo 7 é representado por uma única amostra.

**Tabela 14** - Análise de diversidade genotípica dos isolados de *Trichosporon asahii* por sequenciamento da região IGS1

| AMOSTRAS | ORIGEM | Procedência  | GENÓTIPO IGS1 |
|----------|--------|--------------|---------------|
| 1        | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 2        | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 3        | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 4        | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 5        | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 6        | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 7        | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 8        | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 9        | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 10       | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 11       | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 12       | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 13       | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 14       | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 15       | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 16       | Humana | Bauru-SP     | Genótipo 1    |
| 17       | Humana | Bauru-SP     | Genótipo 7    |
| 19       | Humana | Bauru-SP     | Genótipo 1    |
| 27       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 1    |
| 30       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 1    |
| 31       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 1    |
| 32       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 4    |
| 33       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 4    |
| 34       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 1    |
| 38       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 1    |
| 40       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 1    |
| 41       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 4    |
| 42       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 1    |
| 43       | Humana | Cuiabá-MT    | Genótipo 1    |
| 44       | Humana | São Paulo-SP | Genótipo 1    |
| 47       | Animal | Brasil       | Genótipo 4    |

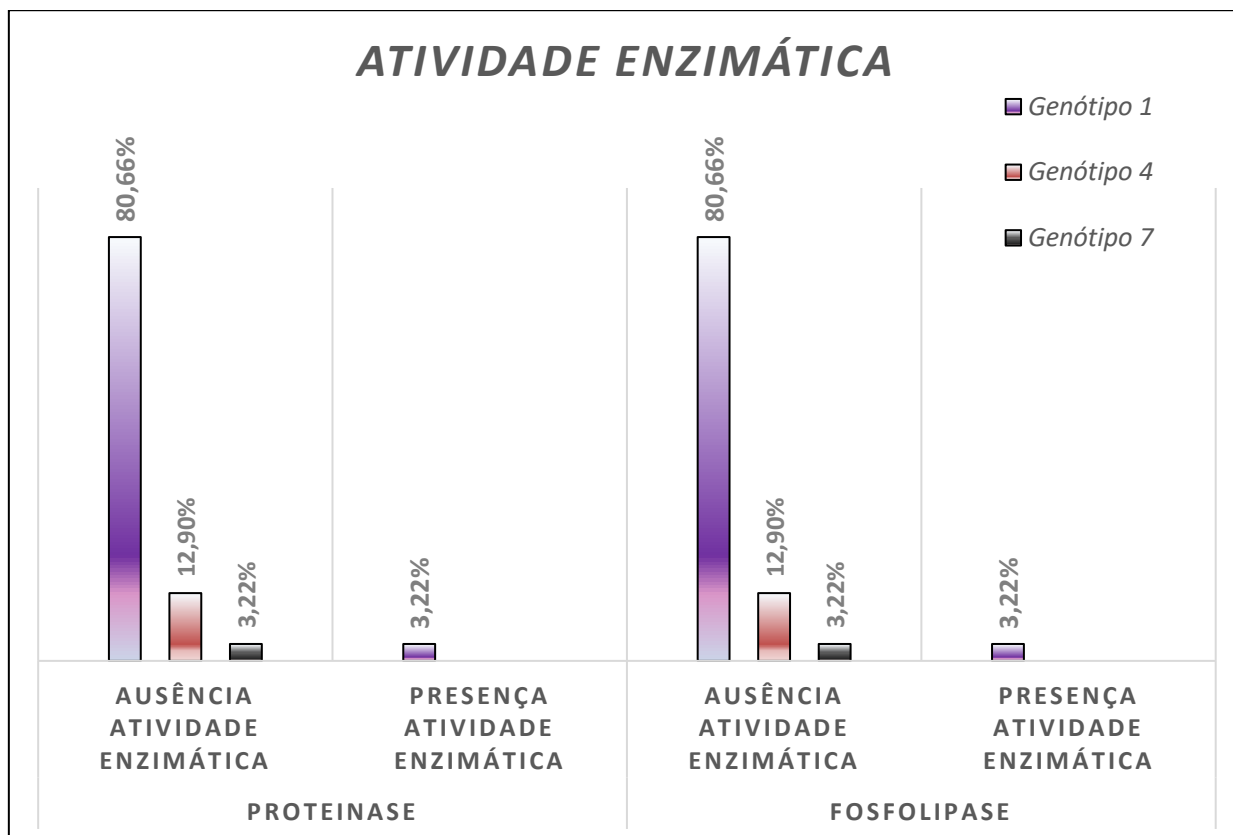


**Figura 08:** Predominância dos genótipos de *T. asahii* por sequenciamento da região IGS1.



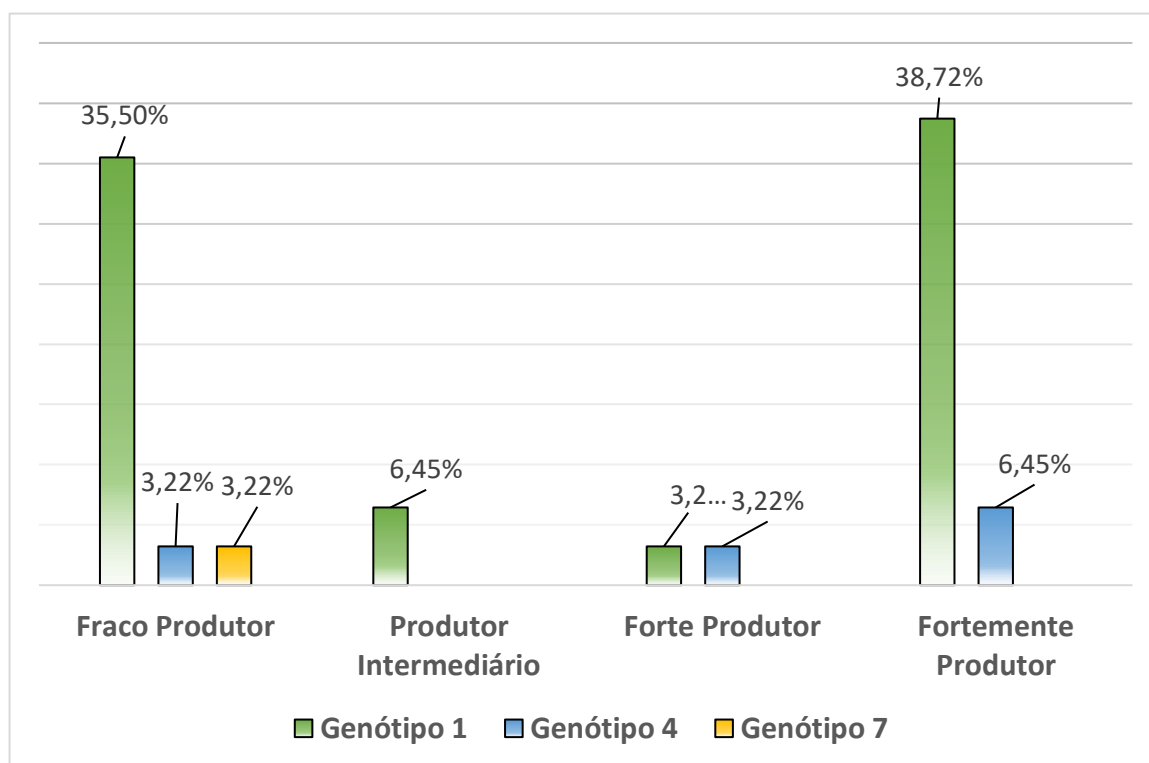
**Figura 09:** Distribuição geográfica dos genótipos de *T. asahii* por sequenciamento da região IGS1.

Não foi observada associação entre os genótipos encontrados e a secreção de enzimas. Apenas 3,22% das amostras apresentaram atividade enzimática, tanto para proteinase quanto para fosfolipase, sendo que em ambos os casos as mesmas foram identificadas como sendo do genótipo 1 (Figura 10).



**Figura 10:** Associação entre atividade enzimática e genótipos de *T. asahii*.

Em relação à produção de biofilme em placas de poliestireno, também não foram observadas associações entre os genótipos e os resultados obtidos. O genótipo 1 foi predominante na presente pesquisa e estes isolados se classificaram como fortemente produtores (38,72%), fracos produtores (35,50%), produtores intermediários (6,45%) e fortes produtores (3,22%) (Figura 11).



**Figura 11:** Associação entre capacidade de produção de biofilme em placas de poliestireno e genótipos de *T. asahii*.

Quanto aos testes de susceptibilidade antifúngica, também não foram observadas alterações nos valores das CIMs que se relacionem com os genótipos de *T. asahii*, tanto na técnica de microdiluição em caldo EUCAST, quanto no método comercial Etest (Tabela 15).

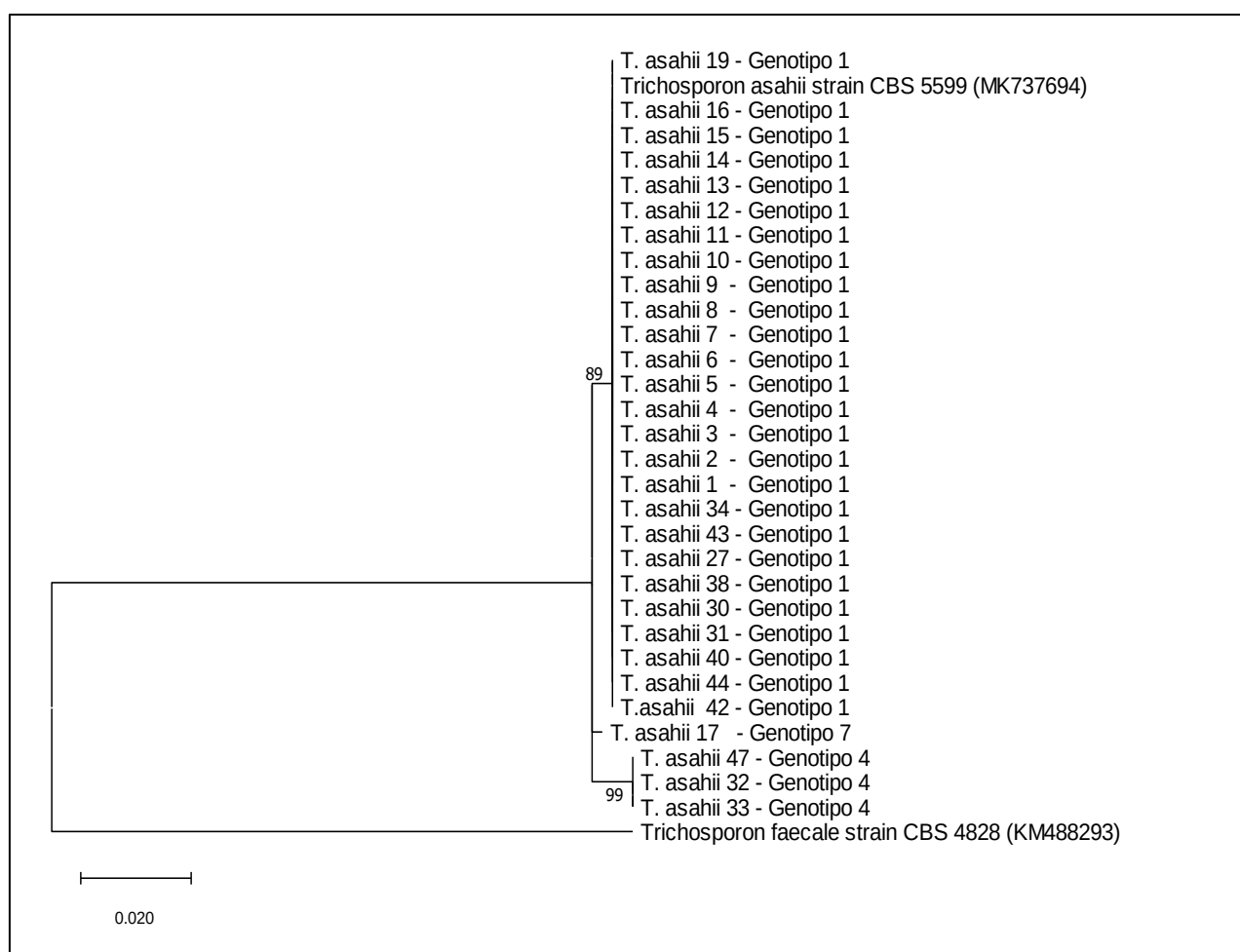
**Tabela 15:** Susceptibilidade antifúngica dos biofilmes pelos 31 isolados de *T. asahii* em relação aos genótipos estudados.

| Antifúngicos   | Genótipo 1<br>(n=26)  | Genótipo 4<br>(n=4)   | Genótipo 7<br>(n=1)   |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                | Range CIMs<br>(µg/mL) | Range CIMs<br>(µg/mL) | Range CIMs<br>(µg/mL) |
| Fluconazol     | 0,5-64                | 64                    | 64                    |
| Itraconazol    | 1-4                   | 4                     | 4                     |
| Voriconazol    | 0,008-4               | 4                     | 4                     |
| Anfotericina B | 4                     | 4                     | 4                     |
| Caspofungina   | 1-4                   | 4                     | 4                     |

Para realização da análise filogenética das amostras de *T. asahii* foram comparados os dados obtidos por meio do sequenciamento da região IGS1 do rDNA. Esta análise envolveu 32 sequências de nucleotídeos, havia um total de 551 posições no conjunto de dados final. As



análises evolutivas foram conduzidas no *software* MEGA X. Com a análise filogenética foi possível verificar que as amostras 17, 47, 32 e 33 se diferenciaram das demais quando devidamente alinhadas na árvore filogenética, tendo maior destaque em sua diferenciação as três últimas citadas. A amostra 17 é um isolado classificado como genótipo 7, enquanto as amostras 47, 32 e 33 se classificam como genótipo 4. Na análise filogenética, não foi possível a inclusão de uma amostra de genótipo 4, uma vez que o sequenciamento realizado, mesmo após várias tentativas, não ficou adequado para este estudo. Todos os isolados de *T. asahii* de genótipo 1 apresentaram similaridade pelo método da máxima verossimilhança (Figura 12).



**Figura 12:** Análise filogenética dos genótipos de *T. asahii*.

*Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

A taxonomia do gênero *Trichosporon* tem evoluído nos últimos anos e novas classificações vem sendo propostas (Liu *et al.*, 2015). Estas alterações taxonômicas e o consequente aumento do número de novas espécies, acarretam novos cenários em relação à variabilidade de fatores relacionados à virulência, manifestações clínicas e susceptibilidade antifúngica. Assim faz-se necessário ferramentas diagnósticas que permitam uma identificação precisa das diferentes espécies fúngicas (Espírito Santo *et al.*, 2020).

A identificação das leveduras patogênicas em laboratórios de micologia médica fundamenta-se em metodologias fenotípicas tradicionais, em sistemas comerciais manuais e automatizados ou em estudos moleculares, sendo este último ainda restrito a laboratórios de pesquisa.

A identificação fenotípica das espécies de *Trichosporon* é realizada por meio do método clássico de observação de suas características microscópicas e macroscópicas. Estes microrganismos formam hifas, pseudohifas, artroconídios e blastoconídios. Em ágar Sabouraud dextrose, crescem como colônias leveduriformes de coloração creme e aspecto cerebriforme. A presença de artroconídios é a principal característica deste grupo de fungos. Complementando os achados morfológicos, também são realizadas provas de assimilação e fermentação de nutrientes, hidrólise da ureia e tolerância do microrganismo a diferentes temperaturas e meios de cultura (Kurtzman, Fell e Boekhout, 2011; Singh *et al.*, 2019).

Existem poucos trabalhos relacionados à identificação fenotípica de isolados de *Trichosporon* spp. por meio do método clássico, provavelmente devido ao fato de esta levedura ser emergente em infecções invasivas e os laboratórios de rotina não estarem preparados para identificação acurada das espécies do gênero. Além disso, poucos trabalhos foram realizados utilizando a metodologia fenotípica para identificação de *Trichosporon* após as revisões taxonômicas do gênero (Chagas-Neto *et al.* 2009).

Neste estudo, para a análise fenotípica, inicialmente foi realizada a purificação das amostras com o auxílio do meio cromogênio CHROMagar *Candida*®, que foi efetivo como método de triagem das amostras na avaliação da pureza e viabilidade das mesmas. Este meio é utilizado comumente em laboratórios clínicos para a identificação presuntiva rápida de isolados de *Candida* spp. por meio da coloração da colônia apresentada pelas diferentes espécies. Entretanto, nos isolados de *Trichosporon* spp. estudados, a coloração apresentada pelas colônias variou entre as diferentes amostras sem demonstrar padronização para o gênero e espécies, não configurando, assim, um parâmetro confiável para identificação presuntiva e

rápida de *Trichosporon* spp.. Bentubo *et al.* (2013), avaliando o comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon* quando semeadas em CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>, também observaram variação de coloração entre os isolados, não recomendando a utilização deste meio para caracterização laboratorial destas leveduras. Outros estudos com *Trichosporon* spp. em meios cromogênicos também relataram estes mesmos achados (Chagas-Neto, 2007; Silvestre-Junior, 2009; Pote *et al.*, 2020). Com o aumento dos diferentes tipos de isolados clínicos e as mudanças na taxonomia das leveduras, é essencial que o uso de meios cromogênicos fique restrito apenas a triagem de amostras (Pote *et al.*, 2020).

Todas as características macro e microscópicas foram condizentes com leveduras do gênero *Trichosporon* spp., ou seja, foram observadas hifas, pseudohifas, artroconídios e blastoconídios. A positividade da urease e a não fermentação de carboidratos foi observada em todos os isolados, uma vez que configuram-se como características típicas do gênero, utilizadas na diferenciação entre outras leveduras como *Candida* spp.. A partir destes achados, somados aos resultados de assimilação de fontes de carbono, as amostras de *Trichosporon* foram caracterizadas com auxílio de chaves taxonômicas de identificação, que se baseiam em características morfológicas e fisiológicas (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Kurtzman, Fell e Boekhout, 2011). Desta forma, foram identificadas 100% das amostras até o nível de espécie. A maior limitação, frente à identificação das leveduras por meio da caracterização fenotípica, ocorreu em relação a necessidade de adaptação de chaves taxonômicas distintas a fim de que as espécies pudessem ser identificadas adequadamente. Vários autores têm proposto chaves taxonômicas para a identificação de *Trichosporon* spp. (Koneman, 1987; Kurtzman, Fell e Boekhout, 2011) e para identificação de espécies patogênicas emergentes (De Hoog, 2000; Rodriguez-Tudela, 2005), no entanto, considerando que a taxonomia de *Trichosporon* spp. vem sendo re-escrita e novas espécies vem sendo incluídas, muitas vezes a identificação fenotípica é incapaz de distinguir algumas espécies, sobretudo, cepas de uma mesma espécie (Pagnocca *et al.*, 2010).

A técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF, utilizada para a identificação de microrganismos, consiste em uma ferramenta físico-química que analisa moléculas orgânicas, principalmente proteínas ribossomais e proteínas que constituem a parede celular (Santos *et al.*, 2010). A mesma vem sendo aplicada com sucesso para identificar uma variedade de fungos, tais como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucorales* (Alanio *et al.*, 2011; De Carolis *et al.*, 2012), *Candida* (Pote *et al.*, 2020), *Cryptococcus* (Hagen *et al.*, 2015), assim como leveduras artroconidiadas de relevância médica (Kolecka *et al.*, 2013). Além disso, este método tem

surgido como uma ferramenta precisa e rápida. Um isolado pode ser processado e identificado em menos de dois minutos, tornando esta ferramenta a próxima geração em identificação de microrganismos (Kolecka *et al.*, 2013).

Nesta pesquisa a técnica de MALDI-TOF identificou 74,5% das amostras de *Trichosporon* spp.. Todas as amostras de origem humana e animal foram identificadas, enquanto para as amostras ambientais a técnica não demonstrou sucesso na identificação. Esta metodologia é atualmente uma ferramenta que apresenta alta especificidade para identificação de isolados de *Trichosporon* em nível de espécie. Entretanto, os resultados são altamente dependentes da qualidade das bibliotecas presentes nos equipamentos utilizados e do método empregado na extração das proteínas (Almeida Junior *et al.*, 2014). Estudos realizados por Almeida-Junior *et al.* (2014) e Kolecka *et al.* (2013), que avaliaram o MALDI-TOF para a identificação de espécies clinicamente relevantes de *Trichosporon*, mostraram que se faz necessária a contínua atualização da base de dados do sistema para que seja alcançado um desempenho ideal de identificação das espécies. De um modo geral, os bancos de dados estão abastecidos com referências de espécies de relevância médica, assim por não serem habitualmente isoladas na rotina clínica, as amostras ambientais deste estudo, certamente não puderam ser identificadas pelo método de MALDI-TOF por ausência de perfis espectrais característicos das espécies no banco de dados.

Métodos baseados em DNA têm sido extensivamente utilizados para a identificação precisa de *Trichosporon* spp.. Neste contexto, os genes ribossomais representam consistentes marcadores de avaliação e incluem alternadamente regiões conservadas (região D1/D2 do rDNA 28S) e regiões variáveis (regiões ITS e IGS1), que podem ser úteis para a identificação de espécies e estudos filogenéticos (Espírito Santo *et al.*, 2020).

A identificação molecular baseada na análise da sequência IGS1 permite identificação precisa de espécies fúngicas, uma vez que esta região tem um alto poder discriminatório entre espécies relacionadas em comparação com outras regiões tais como a região ITS (Sugita *et al.*, 2002; Taverna *et al.*, 2014).

Neste estudo, amplificação e sequenciamento da região IGS1 foi realizada como método padrão ouro na identificação das amostras de *Trichosporon* spp.. A concordância entre a técnica molecular e o método fenotípico foi de 54,2%, sendo que *T. asahii* foi a única espécie em que todos os isolados foram identificados corretamente. Também foram identificadas corretamente as espécies *T. inkin*, *T. coremiiforme* e *T. montevidense*. Rodriguez Tudela *et al.* (2005), comparando a identificação de 49 amostras de *Trichosporon* spp. por meio da análise das

regiões ITS e IGS com técnicas fenotípicas, observaram que 53% dos isolados foram identificados incorretamente utilizando métodos bioquímicos. Os autores também relataram que o sequenciamento da região ITS não foi capaz de diferenciar entre as espécies de *Trichosporon*. Recentemente, Espirito Santo *et al.* (2020) estudaram 26 isolados clínicos de *Trichosporon* spp. e descreveram que apenas 50% das amostras foram corretamente identificadas por método fenotípico quando comparadas ao sequenciamento da região IGS1 do rDNA, sendo identificadas todos os isolados de *T. asahii* e um *T. inkin*.

Como já mencionado, a evolução taxonômica do gênero *Trichosporon* e o aumento do número de novas espécies de leveduras oportunistas causando micoses, tornam a identificação fenotípica dificultosa. Além disso, a identificação convencional por meio de características morfológicas e bioquímicas pode ser laboriosa, acarretando resultados inconclusivos ou presuntivos, particularmente entre as espécies infrequentes (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005).

A técnica MALDI-TOF fornece resultados similares àqueles da técnica molecular, além de oferecer baixo custo por análise e agilidade nos resultados quando comparada a técnica molecular (Almeida Junior *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2016). Poucos são os relatos comparativos de identificação de leveduras do gênero *Trichosporon* utilizando a técnica MALDI-TOF. Pote *et al.* (2020) realizaram uma pesquisa para comparar a identificação de leveduras patogênicas oriundas de diferentes amostras clínicas por meio das técnicas molecular e MALDI-TOF de 176 isolados analisados, 157 (89,2%) foram corretamente identificados utilizando a espectrometria de massa MALDI-TOF, incluindo um único isolado do gênero *Trichosporon*, representado por *T. asahii*. Li *et al.* (2020) observaram concordância entre o MALDI-TOF e a técnica molecular na identificação de amostras de *T. japonicum* causando infecções do trato urinário.

Neste estudo, a concordância dos resultados de identificação do MALDI-TOF com o sequenciamento da região IGS1 foi de 67,8%. A maioria das amostras humana e animal foram identificadas com sucesso. As espécies *T. debeurmannianum*, *T. veenhuisii* e *T. insectorum* não foram identificadas. São espécies ambientais ou incomuns na rotina clínica, o que restringe a eficácia do MALDI-TOF se não houver atualização constante do banco de dados. Todos os isolados da espécie *T. dermatitis* foram identificados incorretamente como *T. mucoides*. Estas duas espécies são geneticamente relacionadas, sendo indistinguíveis por métodos bioquímicos convencionais ou qualquer outro critério taxonômico fenotípico de identificação (Gunn *et al.*, 2006; Chagas-Neto *et al.*, 2009). Almeida *et al.* (2014) estudaram a utilização do método MALDI-TOF na identificação de isolados clínicos de *Trichosporon* spp. e também observaram

identificação equivocada de amostras de *T. dermatis* com *T. mucoides*. Em estudo de Suh *et al.* (2015), 11 cepas de *Trichosporon* foram analisadas por MALDI-TOF para avaliar a técnica como uma possível ferramenta rápida de identificação das duas espécies, e descreveram esta técnica como uma ferramenta confiável e eficiente para identificar estas espécies desde que o banco de dados esteja suprido com cepas referências autenticadas.

A identificação de patógenos fúngicos é essencial, sendo importante na epidemiologia, prescrição da terapia antifúngica apropriada e em estudos taxonômicos. Técnicas de identificação confiáveis são cruciais para revelar o potencial patogênico de espécies incomuns ou descartar espécies anteriormente consideradas patogênicas (Almeida *et al.*, 2014). O MALDI-TOF parece ser particularmente adequado para investigar leveduras do gênero *Trichosporon*, no entanto melhorias ainda são necessárias em relação à atualização do banco de dados, principalmente para espécies incomuns na rotina clínica.

Do total de amostras estudadas, *T. asahii* foi a espécie mais frequente. Analisando as espécies em relação à origem das amostras, *T. asahii* foi mais frequente em amostras humanas, enquanto a espécie *T. debeurmannianum* foi predominante nas amostras ambientais.

*Trichosporon asahii* é um microrganismo comumente encontrado na natureza, ocupando nichos ecológicos em não vertebrados, entretanto possui a capacidade de se manter em organismos vertebrados, causando assim, infecções oportunistas. Esta espécie vem sendo frequentemente isolada da urina de pacientes hospitalizados (Silvestre *et al.*, 2010; Hazirolan *et al.*, 2018). Em adição, *T. asahii* tem sido extensivamente reconhecido mundialmente como um agente emergente de infecções fúngicas invasivas, sendo a espécie mais comumente identificada em casos de tricosporonose disseminada em pacientes imunocomprometidos e em indivíduos com doenças hematológicas (Biasoli *et al.*, 2008; Chagas-Neto *et al.*, 2009; Taverna *et al.*, 2014; Escarrá *et al.*, 2017; Ramirez *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). Poucos estudos relatam infecções por *T. asahii* em indivíduos saudáveis (Ebright *et al.*, 2001; Karabay *et al.*, 2006). Em animais as infecções por espécies de *Trichosporon* têm aumentado, tais como a tricosporonose em gatos (Rissi *et al.*, 2016), meningite canina (Bryan *et al.*, 2014) e infecções cutâneas em tartarugas e pandas gigantes (Nardoni *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2019). No entanto, são poucos os relatos de *T. asahii* causando infecções em animais, sendo geralmente restritos a casos de isolamento em animais saudáveis, uma vez que é encontrado como membro da microbiota (Campagner *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2020).

Entre as amostras ambientais *T. debeurmannianum* foi a única espécie encontrada. Esta espécie foi inicialmente classificada como um sinônimo de *Cryptococcus humicola*. *C.*

*humicola*, entretanto, foi considerada uma espécie heterogênea e dividida em outras espécies por meio da análise das sequências de genes do rRNA (Sugita *et al.*, 2000). Assim, Sugita *et al.* (2001) reclassificaram a espécie dentro do gênero *Trichosporon* como *T. debeurmannianum* e descreveram o primeiro relato desta espécie com cepas isoladas de secreção brônquica e sangue de pacientes hospitalizados (Sugita *et al.*, 2001d). Após o primeiro relato, em 2016, Rastogi e colaboradores isolaram a espécie de casos de onicomicoses na Índia. Suas características ecológicas, epidemiológicas e clínicas permanecem desconhecidas.

Vale ressaltar, neste estudo, a identificação das espécies *T. veenhuisii* e *T. insectorum*, de amostras humana e animal, respectivamente. É a primeira descrição da espécie *T. veenhuisii* na clínica humana (Lara *et al.*, 2019). Esta espécie foi primeiramente isolada de excremento de búfalos na região da Itália (Middelhoven *et al.*, 1985) e desde então nenhum outro relato havia sido realizado na literatura. A cepa foi isolada de lesões de pele de um paciente pediátrico com leucemia mieloide aguda. A espécie *T. insectorum* foi descrita pela primeira vez por Fuentefria *et al.* (2008) como amostras de leveduras *killer* isoladas do intestino de besouros no Panamá (Suh *et al.* 2005) e de queijos no Brasil. Nenhum outro relato desta espécie foi observado na literatura. Os autores sugeriram uma possível contaminação de origem artrópode nos queijos, uma vez que os mesmos eram produzidos artesanalmente com péssimas condições de higiene. Nesta pesquisa a amostra foi isolada da cavidade oral de cães, que também poderiam estar presentes neste sítio por uma possível contaminação com insetos ingeridos pelos animais, hábito comum entre os mesmos. No entanto, para melhor compreensão destes achados são necessários maiores conhecimentos acerca da ecologia de *T. insectorum*, uma vez que outras espécies do gênero podem ser isoladas como colonizantes em cães, entre elas *T. asahii* e *T. mucoides* (Navarro *et al.*, 2020).

Embora espécies de *Trichosporon* apresentem-se como agentes emergentes importantes em casos de infecções fúngicas sistêmicas, poucos são os relatos referentes aos fatores de virulência do gênero. Estes fatores são de relevância para o microrganismo pois permitem o estabelecimento da doença e sua disseminação no hospedeiro (Ramírez & Moncada., 2019; Castano *et al.*, 2021).

Um importante fator associado à virulência é a habilidade do fungo em produzir e secretar enzimas que permitem, principalmente, a invasão do tecido hospedeiro por meio da ruptura da membrana das células. A produção de enzimas extracelulares como proteinases e fosfolipases, podem auxiliar no aumento da patogenicidade fúngica dependendo do nível de expressão e da resposta imune do hospedeiro (Ghannoum, 2000). Além disso estes fatores



interferem na sua capacidade de aderência em células epiteliais ou até mesmo em biomateriais (Cantón *et al.*, 2011; Hernández-Solís, 2014).

A expressão destas enzimas celulares tem sido amplamente estudada em leveduras patogênicas isoladas de seres humanos e animais. Inúmeros pesquisadores têm dispensado atenção a produção enzimática pelo gênero *Candida*, a levedura mais importante como causa de infecções fúngicas nosocomiais (Ruiz *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Ramla *et al.*, 2015). Poucos trabalhos existem na literatura em relação às características de expressão da atividade enzimática em isolados de *Trichosporon* spp.

Neste estudo, a maioria das amostras analisadas foram negativas para a secreção das enzimas proteinase e fosfolipase. A análise estatística não apresentou resultados significativos entre as amostras humanas, animais e ambientais. Hazirolan *et al.* (2018) estudaram os fatores de virulência de 68 amostras de *T. asahii* isoladas de urina de pacientes hospitalizados e em nenhuma das amostras foi observada atividade das enzimas proteinase e fosfolipase. Outros estudos também relataram a ausência de atividade enzimática nas amostras de *T. asahii* estudadas (Dag *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2012; Demir *et al.*, 2014). Nesta pesquisa, das 31 amostras de *T. asahii* estudadas, em apenas uma foi observada a secreção da enzima proteinase enquanto outro isolado da mesma espécie foi capaz de secretar a enzima fosfolipase, ambas as amostras eram de clínica humana. Similarmente, Montoya *et al.* (2017) investigando o perfil enzimático de seis amostras de *T. asahii*, relataram duas amostras positivas com atividade de proteinase. Em contraste, Bentubo *et al.* (2014) observaram a produção das enzimas proteinase e fosfolipase em 50% e 56.8% dos isolados de *Trichosporon* spp., respectivamente. Igualmente, Espirito Santo *et al.* (2020) estudaram 26 amostras de *Trichosporon* spp., provenientes de diferentes pacientes e espécimes clínicos, em relação a fatores de virulência diversos. Os autores observaram secreção de proteinase e fosfolipase em 96% e 50% das amostras, respectivamente. Estes achados podem sugerir mudanças no perfil de expressão destas enzimas por isolados de *Trichosporon* spp., refletindo uma adaptação de cepas de *Trichosporon* spp. aos seus hospedeiros ou nicho ecológico.

Infecções invasivas causadas por *Trichosporon* spp. são comumente associadas com a utilização de cateter venoso central, cateter vesical e dispositivos relacionados a cateteres peritoneais. A habilidade em aderir e formar biofilmes sobre dispositivos implantados pode auxiliar no progresso da tricosporonose invasiva, assim como promover a evasão dos fármacos antifúngicos e da resposta imune hospedeira (Colombo *et al.*, 2011). Em 2006, pesquisas precursoras foram realizadas por Di Bonaventura *et al.* com o objetivo de analisar a capacidade

de formação do biofilme em amostras de *T. asahii*. Os resultados mostraram que os isolados foram capazes de formar biofilme e os autores sugeriram que a habilidade de *T. asahii* para formar biofilme parece ser o fator determinante na persistência da infecção.

Neste estudo, a formação de biofilme dos 59 isolados pertencentes ao gênero *Trichosporon*, foi quantificada por meio do método de coloração com cristal violeta. Assim, foi observado que 100% das amostras produziram biofilme, sendo a maioria (54,3%) classificada como fortemente produtor. Em pesquisa realizada com isolados de *T. asahii* de diferentes materiais clínicos, Dağ *et al.* (2006) relataram que de 48 amostras estudadas, 37,5% foram produtoras fracas e 41,6% não produziram biofilme. Diferentemente de estudo realizado por Montoya *et al.* (2017) no qual 26,5% dos isolados de *T. asahii* foram classificados entre forte a fortemente produtores. Outros estudos também demonstram variável produção de biofilme por diferentes cepas de *T. asahii* (Sun *et al.*, 2012; Iturrieta-González *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2016), assim como por outras espécies do gênero (Iturrieta-González *et al.*, 2014; De Aguiar-Cordeiro *et al.*, 2015; Espírito Santo *et al.*, 2020). A variabilidade observada *in vitro*, em relação à produção de biofilme, nos diferentes estudos, pode estar relacionada ao sítio de isolamento, ao tempo de fase de adesão, ou às características intrínsecas das cepas, tais como genótipos. Outro aspecto se refere às técnicas utilizadas, pois apesar do uso da técnica com cristal violeta mostrar-se um método confiável para quantificação de biofilme em bactérias e leveduras, como previamente demonstrado (Burton *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2013), ainda não existe uma padronização, sendo sua execução e interpretação realizadas por diferentes metodologias ou modificações de variados protocolos. Assim, fica evidente a necessidade de uma padronização do método de quantificação de biofilmes para que seja possível comparar e contrastar apropriadamente os resultados entre os diferentes estudos.

Além disso, embora a formação de biofilmes em dispositivos invasivos seja de grande importância na relação parasita-hospedeiro, e trabalhos relatem a formação de biofilmes por *Trichosporon* spp., pouco ainda se sabe sobre a dinâmica de formação, desenvolvimento e características morfofisiológicas dos biofilmes deste gênero (Iturrieta-Gonzalez *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2016).

Apesar do aumento na relevância do gênero *Trichosporon* na medicina contemporânea, o tratamento de pacientes com tricosporonose permanece um desafio, uma vez que poucos são os dados atuais a respeito da comparação entre as atividades *in vitro* e *in vivo* dos fármacos antifúngicos frente às espécies clinicamente importantes, bem como estudos que comparem diferentes regimes antifúngicos no tratamento dessas infecções (Iturrieta-González *et al.*, 2014;

Almeida *et al.*, 2016). As dificuldades encontradas para a identificação das espécies dentro do gênero e a ausência de padronização dos testes de sensibilidade *in vitro* contribuem na manutenção deste cenário.

Estudos prévios relatam os azóis como os fármacos com melhor atividade antifúngica *in vivo* e *in vitro* sobre *Trichosporon* spp.. Suzuki *et al.* (2010), em estudo envolvendo 33 casos de fungemia por estes fungos em pacientes oncológicos, demonstraram uma maior taxa de sobrevivência em pacientes tratados com azóis do que aqueles tratados com outros fármacos. Em amostras de *T. asahii* isoladas de sangue, Dabas *et al.* (2016) também observaram valores menores de CIMs frente ao itraconazol, voriconazol e posaconazol quando comparadas aos valores apresentados para as equinocandinas e anfotericina B. Mariné *et al.* (2015) realizaram pesquisa que demonstrou a eficácia no tratamento com fluconazol, itraconazol e voriconazol em isolados de *Trichosporon* spp.. No entanto a eficácia do fluconazol ainda é questionável e a evolução de casos de tricosporonose após administração deste fármaco tem sido descrita (Moretti-Branchini *et al.*, 2001). Neste estudo, os resultados corroboraram este fato, uma vez que o fármaco em questão apresentou elevados valores de CIMs nas diferentes espécies. Estes achados também foram observados por Pereira *et al.* (2009) e Almeida Junior e Hennequin, (2016).

As CIMs verificadas para o voriconazol na presente pesquisa foram as menores, o que corrobora com a literatura, uma vez que é considerado por muitos autores como um antifúngico muito potente no tratamento da tricosporonose (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Almeida Junior & Hennequin, 2016; Noy *et al.*, 2020). Terapias bem sucedidas de tricosporonose com uso de voriconazol têm sido relatadas (Asada *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2019), incluindo casos de leucemia aguda e síndrome mielodisplásica com infecção disseminada (Fournier *et al.*, 2002; Serena *et al.*, 2006; Matsue *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). Li *et al.* (2020) realizaram uma revisão sistemática da literatura detalhando 140 casos de infecções por *T. asahii* descritas nos últimos 23 anos, e observaram que o fármaco de escolha para o tratamento destas infecções foi o voriconazol. Os triazóis são considerados o melhor regime para o tratamento de pacientes com tricosporonose documentada. O desenvolvimento de resistência a estes antifúngicos por espécies de *Trichosporon* é alarmante e potencialmente catastrófico uma vez que outras alternativas no tratamento de tais pacientes encontram-se limitadas.

A resistência de leveduras frente à anfotericina B e equinocandinas é uma preocupação porque ambos os agentes antifúngicos são comumente usados como terapia empírica de primeira linha em pacientes com fungemia antes da identificação final do agente etiológico da

infecção. Existem relatos da utilização da anfotericina B no tratamento da tricosporonose, mesmo se tratando de antifúngico que apresenta sensibilidade variada (Pereira *et al.*, 2009; Mariné *et al.*, 2015; Montoya *et al.*, 2017). Neste estudo, os maiores valores de CIM para anfotericina B foram apresentados por *T. asahii*. Em relação às outras espécies de *Trichosporon*, a literatura concorda que as espécies *Trichosporon* não-*asahii* sejam mais susceptíveis à anfotericina B (Paphitou *et al.*, 2002; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005). As equinocandinas são uma classe de antifúngico à qual as leveduras do gênero *Trichosporon* apresentam resistência intrínseca (Chagas-Neto, 2009; Almeida Júnior & Hennequin, 2016) e não são recomendadas para o tratamento da tricosporonose, o que foi confirmado neste estudo com as elevadas CIMs apresentadas por estas leveduras frente à caspofungina. No entanto, a combinação de equinocandinas com anfotericina B ou azóis parece proporcionar algum efeito antifúngico sinérgico *in vitro* e *in vivo* (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005; Castano *et al.*, 2011).

De um modo geral as amostras humanas, animais e ambientais mostraram menor susceptibilidade aos antifúngicos fluconazol e caspofungina em ambas as metodologias empregadas. Importante ressaltar que, juntamente com *T. asahii*, as amostras ambientais representadas por *T. debeurmannianum* apresentaram valores bem maiores de CIM frente ao fluconazol. Além do aumento do consumo de antifúngicos em ambientes hospitalares, o uso de antifúngicos na agricultura pode influenciar significativamente a emergência de fungos ambientais com menor susceptibilidade aos antifúngicos (Verweij *et al.*, 2009; Snelders *et al.*, 2009; Jensen, 2016).

Os testes de susceptibilidade *in vitro* representam uma importante ferramenta para o conhecimento e monitoramento epidemiológico da resistência aos antifúngicos (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015). Este estudo realizou um comparativo das CIMs obtidas pela técnica de microdiluição em caldo EUCAST e pelo Etest. Contudo, é importante enfatizar que, até o momento, os documentos de referência preconizados pelo EUCAST e pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2008a, 2008b, 2012; Lass-Flörl *et al.*, 2011; Hope *et al.*, 2013; Arendrup *et al.*, 2011, 2012, 2014a, 2014b, 2015), não estabelecem *breakpoints* definidos para leveduras do gênero *Trichosporon* frente aos antifúngicos. Tal fato torna a interpretação dos resultados de CIM bastante desafiadora, já que a reação *in vitro* não necessariamente representa a resposta clínica ao tratamento (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015). Por isso, contínuos esforços são necessários para elucidar as possíveis correlações entre as respostas antifúngicas *in vitro* e *in vivo*, a fim de assegurar o sucesso terapêutico (Hadrich e Ayadi, 2018).

De um modo geral, as CIMs foram maiores no método Etest, sendo observada uma discrepância entre os diferentes antifúngicos estudados e espécies identificadas. Poucos são os estudos que avaliam extensivamente a concordância entre as metodologias de susceptibilidade antifúngica para o gênero *Trichosporon*. Matsumoto *et al.* (2007) comparando os métodos EUCAST e Etest com isolados de diferentes espécies de *Trichosporon*, detectaram baixa concordância dos antifúngicos estudados entre as duas técnicas. Lemes *et al.* (2010) descreveram uma ampla discrepância entre o método Etest e a microdiluição em caldo CLSI, para o itraconazol. Treviño *et al.* (2014), estudando amostras de *T. asahii*, observaram resultados discordantes entre os métodos EUCAST e o Etest para anfotericina B, 5-fluorocitosina e caspofungina, considerando, por vezes, alguns resultados do Etest como aberrantes. Neste estudo o itraconazol e a caspofungina também apresentaram valores de CIMs maiores no Etest, no entanto este método demonstrou as menores CIMs para anfotericina B. Park *et al.* (2008) diferentemente, também apresentaram valores elevados de CIM para anfotericina B pelo método Etest em amostras de *Trichosporon*. Arikan *et al.* (2002) e Metin *et al.* (2005) observando valores menores de CIMs frente a anfotericina B pela técnica de microdiluição em caldo, afirmaram que o Etest pode ser mais eficiente que a microdiluição na discriminação de amostras menos susceptíveis a este antifúngico.

Os antifúngicos itraconazol e fluconazol apresentaram as maiores discrepâncias de CIMs relacionadas ao método Etest. Os azóis promovem o chamado fenômeno *trailing* que dificulta a leitura dos testes de sensibilidade. Esta dificuldade nas placas de Etest com os azóis, com a formação de uma elipse com borda difusa e com micro colônias no seu interior, pode sugerir a origem de uma variabilidade e inacurácia na determinação das CIMs com este método.

Diferentes padrões de concordância são apresentados por estudos que comparam metodologias de susceptibilidade antifúngica para amostras de *Trichosporon* spp., assim a validação do significado clínico destas observações exige a determinação de pontos de corte para interpretação das CIMs, bem como estudos de correlação *in vitro* e *in vivo*.

A resistência aos antimicorbianos também pode ser verificada em biofilmes. Quando em biofilme, os microrganismos possuem características fenotípicas diferentes quando comparados ao crescimento planctônico, como proteção aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antifúngicos (Ramage *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Iturrieta-Gonzalez *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2014; Serpa, 2016). Por este motivo, a formação de biofilme possui papel importante no desenvolvimento de infecções (Sardi *et al.*, 2014). A resistência em biofilmes é um fenômeno multifatorial relacionada à limitada penetração e difusão dos antifúngicos na

estrutura multicelular, a presença de células “persistir” resistentes, e a expressão de bombas de efluxo (Melo *et al.*, 2011). Em leveduras do gênero *Candida*, nos últimos anos têm se observado muitos avanços no entendimento dos biofilmes, no entanto algumas questões ainda permanecem desafiadoras como obstáculos por parte regulatória que impedem ensaios clínicos para avaliação de novos agentes a serem utilizados em infecções relacionadas a biofilmes, a falta de um método padrão para determinação da susceptibilidade de biofilmes aos antimicrobianos, e a falta de estratégias definidas para o tratamento de pacientes com infecções associadas a biofilmes (Ghannoum *et al.*, 2015).

Se atualmente pouco se sabe sobre os aspectos de resistência expressos por *Trichosporon* em células planctônicas, menos ainda se sabe sobre os mecanismos de resistência expressos em biofilme. Em pesquisa realizada por Kushima *et al.* (2012), foi observado uma mutação em que se associa a resistência de *Trichosporon* aos antifúngicos azólicos, este mesmo fenótipo de resistência pode ser observado em biofilmes de *Trichosporon* com altas concentrações de antifúngicos (Sun *et al.*, 2012; Iturrieta-Gonzalez *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2014).

No presente estudo, a susceptibilidade de biofilmes dos isolados de *Trichosporon* frente aos antifúngicos utilizados na rotina clínica foi analisada. A maioria das espécies analisadas apresentou valores elevados de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, quando em biofilme, frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina, com CIMs variando de 2 a 66 vezes maiores em relação às células planctônicas. Di Bonaventura *et al* (2006) obtiveram resultados semelhantes com células planctônicas de *T. asahii* que apresentaram valores baixos de CIM para voriconazol e fluconazol e quando realizados os testes com biofilmes os valores apresentaram uma tolerância significativa. Descrevendo a tolerância dos biofilmes aos antifúngicos, Serpa (2016), relatou comportamento do biofilme de *Trichosporon* com valores de CIMs 1024 vezes maiores que as concentrações iniciais frente aos azólicos, e 2 a 34 vezes maiores frente a anfotericina B e caspofungina. Liao *et al* (2014) também relataram valores elevados de CIMs em biofilmes frente a anfotericina B e caspofungina. Cordeiro *et al.* (2021) realizaram uma pesquisa sobre a tolerância antifúngica em biofilme com células persistentes de amostras de *T. asahii* e *T. inkin*, concluindo que ambas as espécies produziram células persistentes em seus biofilmes. Estas células apresentaram elevada tolerância a anfotericina B, além de representarem um inóculo para o crescimento e formação de novos biofilmes, auxiliando na manutenção da virulência.

No presente estudo apenas algumas amostras não apresentaram um aumento significativo nas CIMs dos biofilmes, sendo elas *T. coremiiforme* para fluconazol, *T. insectorum* para voriconazol, *T. montevidense*, itraconazol e *T. veenhuisii* para fluconazol e voriconazol. Ressalta-se que, neste estudo, estas espécies são representadas por um único isolado.

Na presente pesquisa, foi realizada análise genotípica, por meio do sequenciamento da região IGS1, dos 31 isolados de *T. asahii* provenientes de amostras humanas (30) e animal (1). Deste total de amostras da espécie, 83,88% foram identificados como genótipo 1, e os genótipos 4 e 7 também foram identificados com 12,90% e 3,22%, respectivamente. Quanto à localização geográfica, foram isoladas em São Paulo-SP e Cuiabá-MT amostras de *T. asahii* de genótipos 1 e 4, e na cidade de Bauru-SP foram encontrados genótipos 1 e 7 (Tabela 14 e Figura 09).

Inicialmente Sugita *et al.*, (2002) descreveram cinco genótipos diferentes, associando os genótipos 1, 2 e 4 ao Japão e os genótipos 3 e 5 aos Estados Unidos. Entretanto com o avançar das pesquisas essa associação geográfica foi se descaracterizando, uma vez que se observou a ocorrência de genótipos em outras localizações, sugerindo uma variação na distribuição dos mesmos entre as diferentes regiões. Rodriguez Tudela *et al.*, (2007) descreveram 18 isolados de *T. asahii* originários da Espanha, Argentina e Brasil, dos quais 57,3% foram considerados genótipo 1, 14,7% genótipo 3 e 13,1% genótipo 5. Kalkanci *et al* (2010) estudaram amostras de *T. asahii* isoladas na Turquia e pode-se observar a presença do genótipo 1 de forma predominante, seguido dos genótipos 5,3,6,4 e 9, sendo este último descrito pela primeira vez na literatura. A prevalência do genótipo 1 também foi observada na cidade do México em pesquisa realizada por Montoya *et al.*, (2015), na qual foram estudadas 39 amostras de *T. asahii*. No continente africano, Sellami *et al.*, (2017) realizaram análise genotípica de amostras de *T. asahii* e identificaram genótipos 1, 4, 7 e 3. Entretanto, a predominância do genótipo 1 não é observada por alguns autores, como em estudo realizado por Rastogi *et al.*, (2016), que analisaram 20 amostras de *T. asahii* isoladas na Índia, e relataram o genótipo 3 como o mais frequente, seguido pelos genótipos 1 e 7.

No Brasil, é relatada a existência de pelo menos nove genótipos, sendo eles 1,3,4,5,7,13,14,15 e 16, porém a prevalência do genótipo 1 é observada (Francisco, 2015). Este fato corrobora com os dados apresentados em nossa pesquisa. Os genótipos menos comuns encontrados neste estudo podem estar relacionados a tendências epidemiológicas locais.

Neste estudo não foram observadas relações entre os genótipos e os fatores de virulência e susceptibilidade antifúngica. Até o momento não existem estudos que mostrem e estabeleçam

alguma associação entre os genótipos de *T. asahii* e o seu comportamento frente a estas características (Sugita *et al.*, 2002; 2004).

A tricosporonose tem sido cada vez mais relatada mundialmente, portanto, mais informações em relação à diversidade fenotípica, fatores de virulência, sensibilidade antifúngica e epidemiologia de leveduras do gênero *Trichosporon* são essenciais para explorar questões importantes voltadas aos aspectos que envolvem agente etiológico, diagnóstico precoce e terapia adequada, principalmente em pacientes hospitalizados.



*Conclusões*

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ Na reidentificação das 59 amostras de *Trichosporon* spp., o nível de concordância entre as técnicas fenotípica e MALDI-TOF com o método de sequenciamento da região IGS1 foi de 54,2 e 67,8%, respectivamente, principalmente na identificação de *T. asahii*.
- ✓ A espécie mais frequente foi *T. asahii*, seguida por *T. debeurmannianum*, *T. inkin* e *T. dermatis*.
- ✓ Quanto à secreção das enzimas proteinase e fosfolipase, 89,8% e 96,6% das amostras demonstraram ausência de atividade enzimática, respectivamente. Não houve significância estatística em relação à secreção entre as amostras humanas, animais e ambientais.
- ✓ Em relação à capacidade de produção de biofilme, 100% das amostras foram capazes de produzir biofilme, sendo 54,3% consideradas como fortemente produtoras. Não houve significância estatística na formação de biofilme entre as amostras humanas, animais e ambientais.
- ✓ O voriconazol foi o antifúngico que apresentou os menores valores de CIMs frente às amostras estudadas, tanto na técnica de microdiluição em caldo (EUCAST) como no Etest.
- ✓ A caspofungina e o fluconazol foram os antifúngicos com os maiores valores de CIMs.
- ✓ O método Etest mostrou valores de CIMs maiores e discrepantes quando comparados àqueles obtidos por meio da técnica de microdiluição em caldo (EUCAST).
- ✓ Quanto à sensibilidade do biofilme aos antifúngicos, todas as espécies apresentaram valores elevados de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> frente aos antifúngicos testados, sendo exceção a espécie *T. coremiiforme* para fluconazol, *T. montevidense* para itraconazol, *T. insectorum* para voriconazol e *T. veenhuisii* para fluconazol e voriconazol.

- ✓ A análise genotípica dos 31 isolados de *T. asahii* provenientes de amostras humanas e animal, mostrou maior frequência dos isolados pertencentes ao genótipo 1, seguido pelos genótipos 4 e 7.
- ✓ Não houve associação entre os genótipos observados e a produção de enzimas proteinase e fosfolipase estudadas na presente pesquisa.
- ✓ No teste de produção de biofilme em placas de poliestireno não foram apresentadas associações entre os genótipos e os resultados obtidos.
- ✓ Não foram observadas associações entre os valores das CIMs com os genótipos de *T. asahii*.

*Referências*

## 8. REFERÊNCIAS

ALANIO A.; BERETTI J.L.; DAUPHIN B.; MELLADO E.; QUESNE G.; LACROIX C.; AMARA A.; BERCHE P.; NASSIF X.; BOUGNOUX M.E. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. **Clin Microbiol Infect.**, v. 17, n. 5, p. 750-755, 2011.

ALASTRUEY-IZQUIERDO A.; MELHEM M.S.; BONFIETTI L.X.; RODRIGUEZ-TUDELA J.L. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. **Rev Inst Med Trop.**, v. 19, p. 57-64, 2015.

ALMEIDA A.A. de; CRISPIM B do A, GRISOLIA A.B.; SVIDZINSKI T.I.E.; ORTOLANI L.G.; OLIVEIRA K.M.P. de. Genotype, antifungal susceptibility and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n.1, p. 62-66, 2016.

ALMEIDA JÚNIOR J.N.; SONG A.T.; CAMPOS S.V.; STRABELLI T.M.; DEL NEGRO G.M.; FIGUEIREDO D.S; *et al.* Invasive *Trichosporon* infection in solid organ transplant patients: a report of two cases identified using IGS1 ribosomal DNA sequencing and a review of the literature. **Transplant Infectious Disease**, v. 16, n. 1, p. 135-140, 2014.

ALMEIDA JÚNIOR J.N.; HENNEQUIN C. Invasive *Trichosporon* Infection: a Systematic Review on a Re-emerging Fungal Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

ARENDRUP M.C.; SULIM S.; HOLM A.; NIELSEN L.; NIELSEN S.D.; KNUDSEN J.D.; DRENK N.E.; CHRISTENSEN J.J.; JOHANSEN H.G. Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungemia. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3300–3308, 2011.

ARENDRUP M.C.; PERLIN D.S.; JENSEN R.H.; HOWARD S.J.; GOODWIN J.; HOPE W. Differential in vivo activity of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida glabrata* with and without FKS resistance mutations. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.56, p. 2435–2442, 2012.

ARENDRUP M.C.; BOCKHOUT T.; ACOVA M.; *et al.*, ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. **Clin Microbiol Infect.**, v. 20, p. 76-98, 2014a.

ARENDRUP M.C.; HOPE W.; HOWARD S.J. EUCAST definitive document EDef 9.2: **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agentes for conidia forming moulds.** EUCAST, 2014b.

ARENDRUP M.C.; GUINEA J.; CUENCA-ESTRELLA M.; MELETIADIS J.; MOUTON J.W.; LAGROU K.; HOWARD S.J.; SUBCOMMITTEE ON ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING (AFST) OF THE ESCMID EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST), **Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts.** EUCAST E.DEF 7.3, 2015.

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, n. 2, p. 107-111, 2002.

ASADA N.; URYU H.; KOSEKI M.; TAKEUCHI M.; KOMATSU M.; MATSUE K. Successful treatment of breakthrough *Trichosporon asahii* fungemia with voriconazole in a patient with acute myeloid leukemia. **Clin Infect Dis.**, v. 43, n. 4, p. 39-41, 2006.

AULER, M. E. ; MORREIRA, D. ; RODRIGUES, F.F.O. ; ABRÃO, M.S. ; MARGARIDO, P. F.R. ; MATSUMOTO, F. E. ; SILVA, E. G. ; SILVA, B. C.M. ; SCHNEIDER, R. P.; PAULA, C. R. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology.** v. 48, p. 211-216, 2010.

BEHREND, G. Ueber Trichomycosis nodosa (Juhel-Rénoy): Piedra (Osorio). **Berliner Klinische Wochenschrift**, v. 27, p.464-467, 1890.

BENTUBO H.D.L.; GAMBALE W.; FISCHMAN O. Leveduras isoladas do pelame de cães sadios que vivem em regime domiciliar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 1018-1021, 2010.

BENTUBO H.D.L.; GAMBALE W.; FISCHMAN O. Caracterização laboratorial e comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 15, n. 1, p. 69-74, 2013.

BENTUBO H.D.; GOMPERTZ O.F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **Springerplus**, v. 3, p. 1-10, 2014.

BEURMANN, L.; GOUGEROT, H.; Vaucher, Oidiomycose gommeuse, ulcéreuse, disséminée. Mycose nouvelle, dûe à un parasite nouveau: l'Oidium cutaneum (ancien groupe des Blastomycoses). **Rev. Méd.** v. 30, p. 937-958, 1940.

BIASOLI M.S.; CARLSON D.; CHIGANER G.J.; PARODI R.; GRECA A.; TOSELLO M.E.; LUQUE A.G.; MONTERO A. Systemic infection caused by *Trichosporon asahii* in a patient with liver transplant. **Med Mycol.**, v. 46, n. 7, p. 719-723, 2008.

BRYAN L.K.; PORTER B.F.; WICKES B.L.; SPAULDING K.A.; KERWIN S.C.; LAWHON S.D.; Meningoencephalitis in a dog due to *Trichosporon montevidense*. **J Comp Pathol.**, v. 151, n. 2-3, p. 157-161, 2014.

BURTON E.; YAKANDAWALA N.; LOVETRI K.; MADHYASTHA M.S. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 34, n. 1, p. 1-4, 2007.

CALDAS C.C. **Frequência de *Cryptococcus* spp. e outras leveduras com potencial patogênico em excretas de aves silvestres em três municípios do estado de São Paulo.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Programa de Pós Graduação em Saúde Pública, 2017. Márcia de Souza Carvalho Melhem, Orientadora.

CAMPAGNER M.V.; BOSCO S.M.G.; BAGAGLI E.; CUNHA M.L.R.S. ; JERONIMO B.C.; SAAD E.; BISCOLA N.P.; FERREIRA R.S.; BARRAVIERA B. Microbiological Evaluation of Different Strategies for Management of Snakes in Captivity. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. Part A, v. 75, p. 1070-1080, 2012.

CANTÓN R.; RUIZ-GARBAJOSA P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 11, n. 5, p. 477-485, 2011.

CAPOOR M.R.; GUPTA D.K.; VERMA P.K.; SACHDEVA H.C. Rare yeasts causing fungemia in immunocompromised and haematology patients: Case series from Delhi. **Indian J Med Microbiol.**, v. 33, n. 4. P. 576-579, 2015.

CARDONA C.A.M.; RAMIREZ A.O.J.; HORTUA C.V.; FIGUEROA C.T. Piedra negra y piedra blanca: aspectos diferenciales. **Infectio**, v. 17, n. 2, p. 106-110, 2013.

CARREGARO F.B.; SPANAMBERG A.; SANCHES E.M.C.; ARGENTA J.S.; PEREIRA D.I.B.; ZANETTE R.; SANTURIO J.M.; BARCELLOS D.E.S.N.; FERREIRO L. Fungal microbiota isolated from healthy pig skin. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n.2, p. 147-153, 2010.

CARVALHO A.M.; SOUZA L.K.H.; ATAÍDES F.S.; JUNIOR A.K.P. Eggs of tegu lizard, *Salvator merianae* (Duméril & Bilbron, 1839) (Squamata; Teiidae) damage by fungal infections. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 1, p. 112-114, 2020.

CARVALHO V.L. **Fungos Isolados de Sirênios e Cetáceos no Brasil: Uma Abordagem Fenotípica, Genotípica, Diagnóstica e de Virulência**. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2015. Marcos Fábio Gadelha Rocha, Orientador.

CASTANO G.; YARRARAPU S.N.S.; MADA P.K.; *Trichosporonosis*. **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482477/>



CEBALLOS-GARZÓN A.; CORTES G.; MORIO F.; ZAMORA-CRUZ E.L.; LINARES M.Y.; ARIZA B.E.; VALDERRAMA S.L.; GARZÓN J.R.; ALVAREZ-MORENO C.A.; LE PAPE P.; PARRA-GIRALDO C.M.; Comparison between MALDI-TOF MS and MicroScan in the identification of emerging and multidrug resistant yeasts in a fourth-level hospital in Bogotá, Colombia. **BMC Microbiol.** v. 19, n. 1, p. 106, 2019.

CHAGAS-NETO T.C. **Caracterização Microbiológica de Isolados Clínicos de *Trichosporon* spp.** Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 2007. Arnaldo Lopes Colombo, Orientador.

CHAGAS-NETO T.C.; CHAVES G.M.; MELO A.S.; COLOMBO A.L. Bloodstream infections due to *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 1074-1081, 2009.

CHANG Y.L.; YU S.J.; HEITMAN J.; WELLINGTON M.; CHEN Y.L. New facets of antifungal therapy. **Virulence.**, v. 8, n. 2, p. 222-236, 2017.

CHAO Q.T.; LEE T.F.; TENG S.H.; PENG L.Y.; CHEN P.H.; TENG L.J.; HSUEH P.R. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. **PLoS One.** v. 16, n. 9, 2014.

CHO O.; MATSUKURA M.; SUGITA T. Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. **Int J Infect Dis.** v. 39, p. 87-88, 2015.

CHRISTENSEN W.B. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. **J Bacteriol.**, v. 52, n. 4, p. 461-466, 1946.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, in Approved standard M27-A3.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, in 3rd informal Supplement, M27-A3.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth International Supplement. CLSI document M27-4.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COLOMBO A.L.; GUIMARÃES T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v., n.5, 2003.

COLOMBO A.L.; PADOVAN A.C; CHAVES G.M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. And *Trichosporonosis*. **Clinical Microbiology**, v. 24, p. 682-700, 2011.

CORDEIRO R.A.; SERPA R.; MENDES P.B.L.; EVANGELISTA A.J.J.; ANDRADE A.R.C.; *et al.* The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. **Biofouling**, v. 33, n. 7, 2017.

CORDEIRO R.D.A.; AGUIAR A.L.R.; SILVA B.N.; PEREIRA L.M.G.; PORTELA F.V.M.; CAMARGO Z.P.; LIMA-NETO R.G.; CASTELO-BRANCO D.D.S.C.M.; ROCHA M.F.G.; SIDRIM J.J.C. *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. **Front Cell Infect Microbiol.** v.11, 2021.

DA SILVA, E. G.; PAULA, C. R. Virulence profile of strains of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* evaluated by experimental infection in BALB/c mice and correlation with exoenzyme activity. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 139-142, 2006.

DABAS Y.; XESS I.; KALE P. Molecular and antifungal susceptibility study on *Trichosporonemia* and emergence of *Trichosporon mycotoxinivorans* as a bloodstream pathogen. **Medical Mycology**, 2016.

DAĞ A.; CERİKÇİOĞLU N. Investigation of some virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from the clinical samples of hospitalized patients. **Mikrobiyoloji Bülteni**, v. 40, n. 3, p. 225-235, 2006.

DE AGUIAR CORDEIRO R.; SERPA R.; ALEXANDRA C.F.U.; MARQUES F.J.F.; MELO C.V.S.; FRANCO J.S.; EVANGELISTA A.J.J.; CAMARGO.; Z.P.; BRILHANTE R.S.N.; ROCHA M.F.G.; MOREIRA J.L.B.; BANDEIRA T.J.P.G.; SIDRIM J.J.C. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **J Med Microbiol.**, v. 64, n. 11, p. 1277-1286, 2015.

DE CAROLIS E.; POSTERARO B.; LASS-FLÖRL C.; VELLA A.; FLORIO A.R.; TORELLI R.; GIRMENIA C.; COLOZZA C.; TORTORANO A.M.; SANGUINETTI M.; FADDA G. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin Microbiol Infect.**, v. 18, n. 5, p. 475-484, 2012.

DEĞERLİ K.; ECEMİŞ T.; GÜNHAN K.; BAŞKESEN T.; KAL E. Manisa Bölgesinde Otomikoz Etkenleri, 1995-2011 [Agents of otomycosis in Manisa region, Turkey, 1995-2011]. **Mikrobiyol Bul.**, v. 46, n. 1, p. 79-84, 2012.

DE HOOGS G.S.; GUARRO J.; GENE J.; FIGUERAS M.J. **Atlas of Clinical Fungi**, 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.

DEMİR F.; KUŞTIMUR S. Investigation of some virulence factors in *Trichosporon* spp. strains. **Mikrobiyoloji Bülteni**, v. 48, n. 4, p. 628-638, 2014.

DESNOS-OLLIVIER M.; MAUFRAIS C.; PIHET M.; AZNAR C.; DROMER F. French Mycoses Study Group. Epidemiological investigation for grouped cases of *Trichosporon asahii* using whole genome and IGS1 sequencing. **Mycoses**. v. 63, n. 9, p. 942-951, 2020.

DI BONAVENTURA G.; POMPILIO A.; PICCIANI C.; IEZZI M.; D'ANTONIO D.; PICCOLOMINI R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*:

development, architecture, and anti-fungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 3269-3276, 2006.

DING C.H.; KHAITHIR T.M.N.; WAHAB A.A.; FAIZ M.A.; SAARAH W.R. *Trichosporon asahii* fungaemia in an immunocompetent polytrauma patient who received multiple antibiotics. **Malays J Pathol.**, v. 42, n. 2, p. 293-296, 2020.

DINIZ L.M.; SOUZA FILHO J.B. Estudo de 15 casos de pedra branca observados na Grande Vitória (Espírito Santo - Brasil) durante cinco anos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 7, p. 49-52, 2005.

DINIZ A.V.; SILVA I.L.; LOPES V.K.; FRANÇA T.F.; CARVALHO R.R.C.C.; ZANUNCIO V.V. Pedra Branca no Couro Cabeludo em Criança: Relato de Caso. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 30, 2020.

DONLAN R.M.; COSTERTON J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, p.167-193, 2002.

EBRIGHT J.R.; FAIRFAX M.R.; VAZQUEZ J.A. *Trichosporon asahii*, a non-*Candida* yeast that caused fatal septic shock in a patient without cancer or neutropenia. **Clin Infect Dis.**, v. 33, n. 5, p. e28-30, 2001.

ESCARRÁ F.; LEMA J.; CARACCILO B.; CARNOVALE S.; ALVAREZ V.; TRAMONTI N.; GUARRACINO F.; TERESA ROSANOVA M. Sepsis secundaria a infección urinaria asociada a sonda vesical por *Trichosporon asahii* en una unidad pediátrica de quemados: reporte de 2 casos [*Trichosporon asahii* sepsis associated with urinary catheter in a pediatric burn unit: 2 case reports]. **Arch Argent Pediatr.**, v. 115, n. 5, p. e311-e314, 2017.

ESPINEL-INGROFF A.; ARENDRUP M.; CANTÓN E.; CORDOBA S.; DANNAOUI E.; GARCÍA-RODRÍGUEZ J.; GONZALEZ G.M.; GOVENDER N.P.; MARTIN-MAZUELOS E.; LACKNER M.; LASS-FLÖRL C.; LINARES SICILIA M.J.; RODRIGUEZ-IGLESIAS M.A.; PELAEZ T.; SHIELDS R.K.; GARCIA-EFFRON G.; GUINEA J.; SANGUINETTI M.; TURNIDGE J. Multicenter Study of Method-Dependent Epidemiological Cutoff Values for

Detection of Resistance in *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. to Amphotericin B and Echinocandins for the Etest Agar Diffusion Method. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 1, 2017.

ESPINEL-INGROFF A.; TURNIDGE J.; ALASTRUEY-IZQUIERDO A.; BOTTEREL F.; CANTON E.; CASTRO C.; CHEN Y.C.; CHEN Y.; CHRYSSANTHOU E.; DANNAOUI; GARCIA-EFFRON, G., GONZALEZ G.M.; GOVENDER N.P.; GUINEA J.; KIDD S.; LACKNER M.; LASS-FLÖRL C.; LINARES-SICILIA M.J.; LÓPEZ-SORIA L.; MAGOBO R.; TEJADA M. Method-Dependent Epidemiological Cutoff Values for Detection of Triazole Resistance in *Candida* and *Aspergillus* Species for the Sensititre YeastOne Colorimetric Broth and Etest Agar Diffusion Methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n.1, 2019.

ESPÍRITO SANTO E.P.T.; MONTEIRO R.C.; DA COSTA A.R.F.; MARQUES-DA-SILVA S.H. Molecular Identification, Genotyping, Phenotyping, and Antifungal Susceptibilities of Medically Important *Trichosporon*, *Apiotrichum*, and *CutaneoTrichosporon* Species. **Mycopathologia**. v. 185, n. 2, p. 307-317, 2020.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. **Antifungal MIC method for yeasts**. Documento E.Def 7.3.2, EUCAST, abril, 2020.

FERREIRA F.R.; POLLO T.; PEREIRA M.T.F.; BUERI M.N.P. Piedra Branca por *Trichosporon ovoides* no Sudeste do Brasil: Relato e Breve Revisão da Literatura. **Revista SPDV**, v. 77, n. 2, 2019.

FEUGRAY G.; KRZISCH D.; DEHAIS M.; RAZAKANDRAINIBE R.; GARGALA G.; FAVENNEC L.; LEPRETRE S.; CAMUS V.; COSTA D. Successful treatment of *Trichosporon asahii* fungemia with isavuconazole in a patient with hematologic malignancies. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2015-2018, 2019.

FOURNIER S.; PAVAGEAU W.; FEUILLHADE M.; DEPLUS S.; ZAGDANSKI A.M.; VEROLA O.; DOMBRET H.; MOLINA J.M. Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukaemia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 21, n. 12, p. 892-896, 2002.

FRANCISCO, E. C. **Análise da diversidade intraespecífica de *Trichosporon asahii* e *Trichosporon faecale* por biologia molecular e MALDI-TOF MS.** [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2015.

FRANCISCO E.C.; ALMEIDA JUNIOR J.N., QUIROZ TELLES F.; AQUINO V.R.; MENDES A.V.A.; ANDRADE BARBERINO M.G.M.; CASTRO P.T.O.; GUIMARÃES T.; HANH R.C.; PADOVAN A.C.B.; CHAVES G.M.; COLOMBO A.L. Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 909, p. e1-e5, 2019.

FRANCISCO EC, DE ALMEIDA JUNIOR JN, QUEIROZ-TELLES F, AQUINO VR, MENDES AVA, DE OLIVEIRA SILVA M, CASTRO PTOE, GUIMARÃES T, PONZIO V, HAHN RC, CHAVES GM, COLOMBO AL. Correlation of *Trichosporon asahii* Genotypes with Anatomical Sites and Antifungal Susceptibility Profiles: Data Analyses from 284 Isolates Collected in the Last 22 Years across 24 Medical Centers. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 65, n. 3, p. e01104-20, 2021.

FUENTEFRIA A.M.; SUH S.O.; LANDELL M.F.; FAGANELLO J.; SCHRANK A.; VAINSTEIN M.H.; BLACKWELL M.; VALENTE P. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycol Res.**, v. 112, p. 93-99, 2008.

GÁCSEER A.; SCHÄFER W.; NOSANCHUK J.S.; SALOMON S.; NOSANCHUK J.D. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. **Fungal Genet Biol.** V. 44, n. 12, p. 1336-1341, 2007.

GALLIGAN E.R.; FIX L.; HUSAIN S.; ZACHARIAH P.; YAMASHIRO D.J.; LAUREN C.T. Disseminated *Trichosporonosis* with atypical histologic findings in a patient with acute lymphocytic leucemia. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 46, n. 2, p. 159-161, 2019.

GHANNOUM M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 13, n. 1, p. 122-43, 2000.

GHANNOUM M.; ROILIDES E.; KATRAGKOU A.; PETRAITIS V.; WALSH T. J. The Role of Echinocandins in *Candida* Biofilm-Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems. **Clin Infect Dis.** v. 1, n. 61, 2015.

GIRMENIA C.; PAGANO L.; MARTINO B.; D'ANTONIO D.; FANCI R.; SPECCHIA G.; *et al.* Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1818-1828, 2005.

GOMES M.Z; MULANOVICH V.E.; JIANG Y.; LEWIS R.E.; KONTOYIANNIS D.P. Incidence density of invasive fungal infections during primary antifungal prophylaxis in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients in a tertiary cancer center, 2009 to 2011. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 865-873, 2014.

GUÉHO E.; SMITH M.T.; DE HOOGS G.S.; BILLON-GRAND G.; CHRISTEN R.; BATENBURG-VAN DER VEGTE W.H. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 61, n. 4, p. :289-316, 1992.

GUETHI G.G.M. **Caracterização de leveduras do gênero *Trichosporon* isoladas de três regiões costeiras do estado de São Paulo**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2009. Irma Nelly Gutierrez Rivera, Orientadora.

GUNN S.R.; REVELES X.T.; HAMLINGTON J.D.; SADKOWSKI L.C.; JOHNSON-PAIS T.L.; JORGENSEN J.H. Use of DNA sequencing analysis to confirm fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a pediatric patient. **J Clin Microbiol.**, v. 44, n. 3, p. 1175-1177, 2006.

GUO L.N.; YU S.Y.; HSUEH P.R.; AL-HATMI A.M.S.; MEIS J.F.; HAGEN F.; XIAO M.; WANG H.; BARRESI C.; ZHOU M.L.; DE HOOG G.S.; XU Y.C. Invasive Infections Due to *Trichosporon*: Species Distribution, Genotyping, and Antifungal Susceptibilities from a Multicenter Study in China. **J Clin Microbiol.** v. 57, n. 2, p. 505-518, 2019.

HADRICH I.; AYADI A. Epidemiology of antifungal susceptibility: Review of literature. **J Mycol Med.**, v. 28, n. 3, p. 574-584, 2018.

HAGEN F.; KHAYHAN K.; THEELEN B.; KOLECKA A.; POLACHEK I.; SIONOV E.; FALK R.; PARNMEN S.; LUMBSCH H.T.; BOEKHOUT T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet Biol.**, v. 78, p. 16-48, 2015.

HAN M.H.; CHOI J.H.; SUNG K.J.; MOON K.C.; KOH J.K. Onychomycosis and *Trichosporon beigeli* in Korea. **Int J Dermatol.**, v. 39, n. 4, p. 266-269, 2000.

HAZIROLAN G.; KOÇAK N.; KARAGÖZ A. Sequence-based identification, genotyping and virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from urine samples of hospitalized patients (2011-2016). **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 3, p. 452-456, 2018.

HERNÁNDEZ-SOLÍS S.E.; RUEDA-GORDILLO F.; ROJAS-HERRERA R.A. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos [Proteinase activity in *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of immunocompromised patients, with oral candidiasis and in healthy subjects]. **Rev Iberoam Micol.**, v. 321, n. 2, p. 137-140, 2014.

HÖFS S.; MOGAVERO S.; HUBE B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **J Microbiol.** v. 54, n. 3, 2016.

HOPE W.; NATARAJAN P.; GOODWIN L. Invasive fungal infections. **Clin Med.**, v. 13, n. 5, p. 507-510, 2013.

IQBAL N.; AMMAR M.; IRFAN M.; JABEEN K. *Trichosporon* Species and *Fusarium* Species as a Cause of Empyema Thoracis in a Diabetic Patient. *Cureus*, **Cureus**, v.12, n. 7, 2020.



ITURRIETA-GONZÁLES I.A.; PADOVAN A.C.B.; BIZERRA F.C.; HAHN R.C.; COLOMBO A.L. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-10, 2014.

JENSEN R.H. Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. **Dan Med J.** v. 63, n. 10, 2016.

JESUS D.F.F. de. **Caracterização molecular e análise da expressão gênica de adesivas na levedura emergente *Trichosporon asahii***. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Alfenas, 2018. Ana Carolina Barbosa Padovan, Orientadora.

JIN Y.; YIP H.K.; SAMARANAYAKE Y.H.; YAU J.Y.; SAMARANAYAKE L.P. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2961-2967, 2003.

PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W. Yeasts from beaches in the southern area of São Paulo, State of São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 14, p. 136-143, 1983.

PAULA, C. R.; MONTELLI, A. C.; RUIZ, L. S.; BATISTA, G. C. M.; MATSUMOTO, F. E.; VOLPEARNONI, M.; VIANI, P. R. C.; KHOURI, S.; GONTIJO, V.; KREBS, V.L. Infecção Hospitalar Fúngica: Experiência em Hospitais Públicos de São Paulo. **Prática Hospitalar** (Online), v. IX, p. 63-66, 2007.

KALKANCI A. *et al.* Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients. **Med Mycol.** v. 48, n. 1, p. 141-146, 2010.

KARABAY O.; MADARIAGA M.G.; KOCOGLU E.; INCE N.; KANDIRALI E. *Trichosporon asahii* fungemia in a patient with non-hematological malignancy. **Jpn J Infect Dis.**, v. 59, p. 2, p. 129-131, 2006.

KAUFMAN D.; BOYLE R.; HAZEN K.C.; PATRIE J.T.; ROBINSON M.; DONOWITZ L.G. Fluconazole prophylaxis against fungal colonization and infection in preterm infants. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 23, p. 1660-1666, 2001.

KIKI-BARRO P.C.M.; KONATÉ A.; KASSI F.K.; ANGORA E.K.; BOSSON-VANGA H.; BEDIA-TANOAH A.V.; DJOHAN V.; YAVO W.; MENAN E.I.H. Profil mycologique des onychomycoses des mains chez les vendeurs de « Garba » à Abidjan (Côte d'Ivoire) [Mycological profile of hand onychomycosis amongs "Garba" sellers in Abidjan (Côte d'Ivoire)]. **J Mycol Med.**, v. 27, n. 5, p. 543-548, 2017.

KOKSAL F.; ER E.; SAMASTI M. Causative agents of superficial mycoses in Istanbul, Turkey: retrospective study. **Mycopathologia**. v. 168, n. 3, p. 117-123, 2009.

KOLECKA A.; KHAYHAN K.; GROENEWALD M.; THEELEN B.; ARABATZIS M.; VELEGRAKI A.; KOSTRZEWA M.; MARES M.; TAJ-ALDEEN S.J.; BOEKHOUT T. Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol.**, v. 51, n. 8, p. 491-500, 2013.

KOTWAL S.; SUMBALI G.; SHARMA S.; KAUL S. Detection of some new *Trichosporon* species from the dystrophied nails of three female members of a family from North Indian State of Jammu and Kashmir. **Mycoses**. v. 61, n. 8, p. 534-542, 2018.

KONEMAN E.K.; ROBERTS G.D. **Micología práctica de laboratorio**. Buenos Aires; Bogotá: Editorial Médica Panamericana, 1987.

KRCMERY V.J.R.; ORAVCOVA E.; SPANIK S.; MRAZOVA-STUDENA M.; TRUPL J.; KUNOVA A.; STOPKOVA-GREY K.; KUKUCKOVA E.; KRUPOVA I.; DEMITROVICOVA 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, n. 3, p. 373-380, 1998.

KUHN D.M.; GEORGE T.; CHANDRA J.; MUKHERJEE P.K.; GHANNOUM M.A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1773-1780, 2002.

KUMAR C.P.; MENON T.; SUNDARARAJAN T.; NALINI S.; THIRUNARAYAN M.A.; RAJASEKARAN S.; VENKATADESIKALU M. Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. **Rev Iberoam Micol.**, v. 23, n. 2, p. 101-103, 2006.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KURAKADO S.; MIYASHITA T.; CHIBA R.; SATO C.; MATSUMOTO Y.; SUGITA T. Role of arthroconidia in biofilm formation by *Trichosporon asahii*. **Mycoses**. 2020.

KURTZMAN C.P.; FELL J.W. BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. New York: ACM Press, 2011.

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

LACAZ C.S.; PORTO E.; VACCARI E.M.H.; MELO N.T. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.

LACAZ C.S.; PORTO E.; MARTINS J.E.C.; HEINS-VACCARI E.M. & TAKAHASHI DE MELO N. – **Tratado de Micologia médica**; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

LARA B.R.; MELO M.B.A.; PAULA C.R.; ARNONI M.V.; SIMÕES C.C.N.; NAKANO S.; RICHINI-PEREIRA V.B.; GARCES H.G.; MACIEL DA SILVA B.C.; ANVERSA L.; GONÇALVES SILVA E.; AULER M.E.; OLIVEIRA DOS SANTOS R.L.; DA SILVA RUIZ L. *Apiotrichum veenhuisii* isolated from a pediatric patient with acute myeloid leukemia: The first case in humans. **Mycologia**. v. 111, n. 5, p. 793-797, 2019.

LASS-FLÖRL C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. **Drugs.**, v. 71, n. 18, 2011.

LEE E.Y.; KOH M.J.A. A rare case of cutaneous *Trichosporon asahii* infection in an immunocompromised child. **Pediatr Dermatol.**, v. 37, n. 5, p. 962-963, 2020.

LEMES R.M.; LYON J.P.; MOREIRA L.M.; DE RESENDE M.A. Antifungal susceptibility profile of *Trichosporon isolates*: correlation between CLSI and etest methodologies. **Braz J Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 310-315, 2010.

LI H.; LU Q.; WAN Z.; ZHANG J. In vitro combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 35, n. 6, p. 550-552, 2010.

LI H.; GUO M.; WANG C.; LI Y.; FERNANDEZ A.M.; FERRARO T.N.; YANG R.; CHEN Y. Epidemiological Study of *Trichosporon Asahii* Infections Over the Past 23 Years. **Epidemiology and Infection**, p. 1-24, DOI 10.1017/S0950268820001624, 2020.

LI X.; YAN Z.; XU J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology.** v, 149, p. 353-362, 2003.

LIAO, Y. *et al.* In vitro activities of antifungal combinations against biofilms and planktonic forms of clinical *Trichosporon asahii* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 12, p. 7615–7616, 2014.

LIAO, Y.; *et al.* Epidemiology and Outcome of *Trichosporon* Fungemia: A Review of 185 Reported Cases. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, 2015.

LIMA-NETO R.; SANTOS C.; LIMA N.; SAMPAIO P.; PAIS C.; NEVES R.P.; Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 515-522, 2014.

LIU X.Z.; WANG Q.M.; GÖKER M.; GROENEWALD M.; KACHALKIN A.V; LUMBSCH H.T.; MILLANES M.; YURKOV A.M.; BOEKHOUT T.; BAI F.Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 85–147, 2015.

LOUREIRO S.T.A. **Caracterização de leveduras isoladas das praias de Casa Caiada e Bairro Novo, Olinda – Pernambuco quanto a fatores de patogenicidade**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos. 2002. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti, Orientadora.

MA X.; JIANG Y.; WANG C.; GU Y.; CAOL S.; HUANG X.; WEN Y.; ZHAOL Q.; XINTIAN R.W.; YAN Q.; HAN X.; ZUOL Z.; DENG J.; REN Z.; YU S.; SHEN L.; ZHONG Z.; PENG G.; LIU H.; ZHOU Z. Identification, genotyping, and pathogenicity of *Trichosporon* spp. Isolated from Giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). **BMC Microbiology**, v. 19, 2019.

MACEDO, E. C. **Principais grupos de fungos: uma interpretação com base em sua sistemática filogenética**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo. 2017. Nelson Menolli Junior, Orientador.

MAGALHÃES A.R.D. **Caracterização morfológica e bioquímica de isolados clínicos de *Trichosporon* spp. no Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós Graduação em Patologia, 2008. Silvia Susana Bona de Mondino, Orientadora.

MAIA, L. C. *et al.* Diversity of Brazilian Fungi. **Rodriguésia**. v. 66, n. 4, p. 1033–1045, 2015.

MANZELLA J.P.; BERMAN I.J.; KUKRIKA M.D. *Trichosporon beigeli* fungemia and cutaneous dissemination. **Archives of Dermatological Research**, v.118, p. 343-345, 1982.

MARINÉ M.; BROWN N.A.; RIAÑO-PACHÓN D.M.; GOLDMAN G.H.; On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by *Trichosporon* Species. **PLoS Pathog.**, v. 11, n. 7, 2015.

MARQUES A.S.; RICHINI-PEREIRA V.B.; CAMARGO R.M.P. White piedra and pediculosis capitis in the same patient. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 5, p. 786-787, 2012.

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

MATSUE K.; URYU H.; KOSEKI M.; ASADA N.; TAKEUCHI M. Breakthrough *Trichosporon*osis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin. **Clin Infect Dis.**, v. 42, n. 6, p. 753-757, 2006.

MATSUMOTO F.E.; DIAS A.L.; MELHEM M.S.; SZESZS M.W.; AULER M.E.; RUIZ L.S., GONÇALVES DA SILVA E.; GANDRA R.F.; PAULA C.R. Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the Etest and the AFST-EUCAST microdilution method. **Can J Microbiol.**, v. 53, n. 12, p. 1300-1306, 2007.

MATTEDE M.G.S.; PIRAS C.; MATTEDE K.D.S.; FERRARI A.T.; BALDOTTO L.S.; ASSBU M.S.Z. Infecções urinárias causadas por *Trichosporon* spp. em pacientes graves internados em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 27, n. 3, p. 247-251, 2015.

MELO A.S.; BIZERRA F.C.; FREYMÜLLER E.; ARTHINGTON-SKAGGS B.A.; COLOMBO A.L. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Med Mycol.**, v. 49, n. 3, p. 253-262, 2011.

Mello V.G.; Escudeiro H.; Weckwerth A.C.V.B.; Andrade mi.; Fusaro A.L.; Moraes E.B.; Ruiz L.S.; Baptista I.M.F.D Virulence Factors and Antifungal Susceptibility in *Candida* Species Isolated from Dermatomycosis Patients. **Mycopathologia**, v. 186, n. 1, p. 71-80, 2021.

METIN D.Y.; HILMIOGLU-POLAT S.; HAKIM F.; INCI R.; Tumbay E. Evaluation of the microdilution, Etest and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of clinical strains of *Trichosporon* spp. **J Chemother.**, v. 17, n. 4, p. 404-408, 2005.

MEYER M.H; *et al.* Chronic disseminated *Trichosporon asahii* infection in a leukemic child. **Clin Infect Dis**, v. 35, p. 22-25, 2002.

MICELI M.H.; DÍAZ J.A.; LEE S.A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect Dis**. v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.

MICELI M.H.; LEE S.A. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. **Mycoses**. v. 54, n. 6, p. e666-678, 2011.

MIDDELHOVEN W.J.; HOOGKAMER-TE NIET M.C.; KREGER-VAN RIJ N.J. *Trichosporon adeninovorans* sp. nov., a yeast species utilizing adenine, xanthine, uric acid, putrescine and primary n-alkylamines as the sole source of carbon, nitrogen and energy. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 4, p. 369-378, 1984.

MIDDELHOVEN W.J.; DE KIEVIT H.; BIESBROEK A.L. Yeast species utilizing uric acid, adenine, n-alkylamines or diamines as sole source of carbon and energy. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 51, n. 3, p. 289-301, 1985.

MILAN E. P.; SILVA-ROCHA W. P.; DE ALMEIDA J.; FERNANDES; T.; DE ARAÚJO PRUDENTE A. L.; DE AZEVEDO M. F.; FRANCISCO E. C.; DE AZEVEDO MELO A. S.; COLOMBO A. L.; CHAVES G. M. *Trichosporon inkin* meningitis in Northeast Brazil: first case report and review of the literature. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 470, 2018.

MONTOYA A.M.; SÁNCHEZ GONZÁLEZ A.; PALMA-NICOLÁS J.P.; GÓMES- TEVIÑO A.; GONZÁLEZ J.G.; GONZÁLEZ G.M. Genotyping, extracellular compounds, and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated from Mexican patients. **Medical Mycology**, v. 53, n. 5, p. 505-511, 2015.

MONTOYA A.M.; ELIZONDO-ZERTUCHE M.; TREVIÑO-RANGEL R.J.; BECERRIL-GARCÍA M.; GONZÁLEZ G.M. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 1, p. 22-26, 2017.

MONZANI V.; CORDOBA S.; VIVOT M.; ARIAS B.; VIVOT W.; SZUSZ W.; CASTELLARO P.; APPENDINO A.; TAVERNA C.G. A case report of catheter-related bloodstream infection due to *Trichosporon coremiiforme* in a patient with secondary neutropenia to HIV. **Journal de Mycologie Medicale**, 2019.

MORETTI-BRANCHINI M.L.; *et al.* *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. Diagnostic **Microbiology and Infectious Disease**, v. 39, p. 161-164, 2001.

MOYLETT E.H.; CHINEN J.; SHEARER W.T. *Trichosporon pullulans* infection in 2 patients with chronic granulomatous disease: an emerging pathogen and review of the literature. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 111, n. 6, p. 1370-1374, 2003.

NAGLIK J.; ALBRECHT A.; BADER O.; HUBE B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol.** v. 6, n. 10, p. 915-926, 2004.

NARDONI S.; SALVADORI M.; POLI A.; ROCCHIGIANI G.; MANCIANTI F. Cutaneous lesions due to *Trichosporon jirovecii* in a tortoise (*Testudo hermanni*). **Med Mycol Case Rep.**, v. 18, p. 18-20, 2017.

NATH R.; SARGIARY P.; BORKAKOTY B.; Parida P. *CutaneoTrichosporon (Trichosporon) debeurmannianum*: A Rare Yeast Isolated from Blood and Urine Samples. **Mycopathologia.** v. 183, n. 3, p. 585-590, 2018.

NAVARRO B.S.; AULER M.E.; SANTOS R.L.O.D.; RUIZ L.D.S.; NASCIMENTO D.C.; FELIPPE P.A.N.; DOMANESCHI C.; MOREIRA D.; DE ASSIS BARONI F.; DE FATIMA COSTA PIRES M.; PAULA C.R, Antifungal sensitivity and species of yeasts in oral mucosa of street mixed-breed dogs, **Journal de Mycologie Médicale**, 2020.

NOY M.L.; ABDOLRASOULI A.; BORMAN A.M.; FRASER M.; FRANCIS N.; MOORE L.S.P.; MERIKA E.E. *CutaneoTrichosporon (Trichosporon) debeurmannianum* associated



with a subcutaneous mycotic cyst successfully treated with voriconazole. **Clin Exp Dermatol.**, v. 45, n. 2, p. 250-253, 2020.

NUCCI M.; QUEIROZ-TELLES F.; TOBÓN A.M.; RESTREPO A.; COLOMBO A.L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis.** v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

NUNES J.M.; BIZERRA F.C.; FERREIRA R.C.; COLOMBO A.L.; Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, n. 1, p. 382-389, 2013.

OGURA M.; KAGAMI S.; NAKAO M.; KONO M.; KANETSUNA Y.; HOSOYA T. Fungal granulomatous interstitial nephritis presenting as acute kidney injury diagnosed by renal histology including PCR assay. **Clin Kidney J.**, v. 5, n. 5, p. 459-462, 2012.

OKABAYASHI K.; IMAJI M.; OSUMI T.; MURAKAMI Y.; MARUYAMA H.; KANO R.; HASEGAWA A.; WATANABE T. Antifungal activity of itraconazole and voriconazole against clinical isolates obtained from animals with mycoses. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.** v. 50, n. 2, p. 91-94, 2009.

OLIVEIRA DOS SANTOS C.; ZIJLSTRA J.G.; PORTE R.J.; KAMPINGA G.A.; VAN DIEPENINGEN A.D.; SINHA B.; BATHOORN E. Emerging pan-resistance in *Trichosporon* species: a case report. **BMC Infect Dis.**, v. 14, n. 16, p. 148, 2016.

OTA, M. Sur quelques champignons pathogènes du type *Trichosporon beigelli* Vuillemin. **Annls Parasit. Hum. Comp.** v. 4, p. 1-13, 1926.

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. 479-482, 2003.

PAGNOCCA F.C, *et al.* Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov. an anamorphic basidiomycetous yeast.

**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1454-1459, 2010.

PALDRYCHOVÁ M.; KOLOUCHOVÁ I.; VAŇKOVÁ E.; MAŤÁTKOVÁ O.; ŠMIDRKAL J.; KRMELA A. SCHULZOVÁ V.; HAJŠLOVÁ J.; MASÁK J. Effect of resveratrol and Regrapex-R-forte on *Trichosporon cutaneum* biofilm. **Folia Microbiol (Praha)**. v. 64, n. 1, p. 73-81, 2019.

PAPHITOU N.I.; OSTROSKY-ZEICHNER L.; PAETZNICK V.L.; RODRIGUEZ J.R.; CHEN E.; REX J.H. In vitro antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46, n. 4, p 1144-1146, 2002.

PARK J.Y.; SHIN J.H.; UH Y.; KIM E.C.; KEE S.J.; KIM S.H.; SHIN M.G.; SUH S.P.; RYANG D.W. In vitro amphotericin B susceptibility of korean bloodstream yeast isolates assessed by the CLSI broth microdilution method, Etest, and Minimum fungicidal concentration test. **Korean J Lab Med.**, v. 28, n. 5, p. 346-352, 2008.

PEREIRA D.N.; NADER S.S.; NADER P.; MARTINS P.G.; FURLAN S.P.; Hentges C.R. Disseminated *Trichosporon* spp infection in preterm newborns: a case report. **J Pediatr.**, v. 85, n. 5, p. 459-461, 2009.

PERFECT J.R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nat Rev Drug Discov.** v. 16, n. 9, p. 603-616, 2017.

PONTES Z.B.; RAMOS A.L.; LIMA E.O. GUERRA M.F.; OLIVEIRA N.M.; SANTOS JP. Clinical and Mycological Study of Scalp White Piedra in the State of Paraíba, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 747-750, 2002.

PONTES Z.B.; SILVA A.D.; LIMA E.O.; GUERRA M.D.E H.; OLIVEIRA N.M.; CARVALHO M.F.F.P.; GUERRA F.S.Q. Otomycosis: a retrospective study. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 75, n. 3, p. 367-370, 2009.

POTE S.T.; SONAWANE M.S.; RAHI P.; SHAH S.R.; SHOUCHE Y.S.; PATOLE M.S.; THAKAR M.R.; SHARMA R. Distribution of Pathogenic Yeasts in Different Clinical Samples: Their Identification, Antifungal Susceptibility Pattern, and Cell Invasion Assays. **Infect Drug Resist.** v. 13, p. 1133-1145, 2020.

PRICE, M.F.; WILKINSOD, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

RABENHORST, L. **Zwei Parasiten an den todtten Haaren der Chignons.** *Hedwigia*. 4:1, 1867.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Inter. J. Microbiol.**, v. 2012, 2012.

RAMLA S.; SHARMA V.; PATEL M. Influence of cancer treatment on the *Candida albicans* isolated from the oral cavities of cancer patients. **Support Care Cancer.**, v. 24, n. 6, 2016.

RAMÍREZ L.; MONCADA D. Fatal Disseminated Infection by *Trichosporon asahii* Under Voriconazole Therapy in a Patient with Acute Myeloid Leukemia: A Review of Breakthrough Infections by *Trichosporon* spp. **Mycopathologia**, <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00416-w>, 2019.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia** - 8. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REDÜ J.F.M. **Atividade biocida de desinfetantes e fitoquímicos frente a fungos isolados de animais silvestres mantidos em centro de recuperação.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014. João Roberto Braga de Mello, Orientador.

REINHART H.H.; URBANSKI D.M.; HARRINGTON S.D.; SOBEL J.D. Prosthetic valve endocarditis caused by *Trichosporon beigellii*. **The American Journal of Medicine**, v. 84, p. 355-358, 1988.

REVIE N.M.; IYER K.R.; ROBBINS N.; COWEN L.E.; Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Curr Opin Microbiol.**, v. 45, p. 70-76, 2018.

RISSI D.R.; KIRBY K.D.; SANCHEZ S. Systemic *Trichosporon loubieri* infection in a cat. **J Vet Diagn Invest.**, v. 28, n. 3, p; 350-353, 2016.

RIZZITELLI G.; GUANZIROLI E.; MOSCHIN A.; SANGALLI R.; VERALDI S. Onychomycosis caused by *Trichosporon mucoides*. **Int J Infect Dis.**, v. 42, p. 61-63, 2016.

ROBBINS N.; WRIGHT G.D.; COWEN L.E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiol Spectr.** v. 4, n. 5, 2016.

ROBINSON K.; XIAO Y.; JOHNSON T.J.; CHEN B.; YOUNG Q.; LYU W.; WANG J.; FANSLER N.; BECKER S.; LIU J.; YOUNG H.; ZHANG G. Chicken intestinal mycobiome: Initial Characterization and Its Response to Bacitracin Methylene Disalicylate. **Applied and Environmental Microbiology**, 2020.

RODRIGUEZ-TUDELA J.L; *et al.* Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4026-4034, 2005.

RODRIGUEZ-TUDELA J.L.; GOMEZ-LOPEZ A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO A.; MELLADO E.; BERNAL-MARTINEZ L.; CUENCA-ESTRELLA M. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 58, n. 4, p. 435-440, 2007.

RUAN S.Y.; CHIEN J.Y.; HSUEH P.R. Invasive *Trichosporonosis* caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, e11-17, 2009.

RUCHEL R.; TEGELER R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 3, p. 233-244, 1982.

RUIZ, L.S.; SUGIZAKI, M.F.; MONTELLI, A.C.; MATSUMOTO, F.E.; PIRES, M.F.C.; DA SILVA, B.C.M.; SILVA, E.H.; GANDRA, R.F.; GONÇALVES DA SILVA, E.; AULER, M.E.; PAULA, C.R. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 15, p. 13-21, 2005.

RUIZ, L. S.; KHOURI, S.; HAHN, R. C.; SILVA, E. G.; OLIVEIRA, V. K. P.; GANDRA, R F.; PAULA, C. R. Candidemia by Species of the *Candida parapsilosis* Complex in Children s Hospital: Prevalence, Biofilm Production and Antifungal Susceptibility. **Mycopathologia** (1975. Print), v. 175, p. 231-239, 2013.

SABINO A. A.; DA SILVA C. M.; DA SILVA D. L.; MARTINS C. V.; DE RESENDE M. A.; DIAS E. S.; MAGALHÃES T. F.; *et al.* Synthesis of aryl aldimines and their activity against fungi of clinical interest. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 78, n. 5, p. 810-815, 2011.

SAH R.; SOIN A.S.; CHAWLA S.; WADHWA T.; GUPTA N. Disseminated *Trichosporon asahii* infection in a combined liver-kidney transplant recipient successfully treated with voriconazole. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 7, p. 125-129, 2019.

SANTIN R.; MATTEI A. S.; WALLER S. B.; MADRID I. M.; CLEF M. B.; XAVIER M. O.; NOBRE M. O.; NASCENTE O. S.; MELLO J. R. B.; MEIRELES M. C. A. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. **Brazilian Jornal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 136-143, 2013.

SANTOS C.; PATERSON R. R.; VENÂNCIO A.; LIMA N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J Appl Microbiol.**, v. 108, n. 2, p. 375-385, 2010.

SANTOS L. B. S. **Análise filogenética da espécie *Trichosporon asahii* por sequenciamento multilocus**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina,

Programa de Pós Graduação em Dermatologia, 2019. João Nobrega de Almeida Júnior, Orientador.

SELLAMI H.; TRABELSI H.; NEJI S.; AMOURI I.; CHEIKHROUHOU F.; MAKNI F.; AYADI A. First genotype identification of *Trichosporon asahii* in Sfax, Tunisia. **J Med Microbiol.** v. 66, n. 4, p. 397-401, 2017.

SARDI J. D. E. C.; PITANGUI N. D. E. S.; RODRÍGUEZ-ARELLANES G.; TAYLOR M. L.; FUSCO-ALMEIDA A. M.; MENDES-GIANNINI M. J. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Rev Iberoam Micol.** v. 31, n. 1, p. 22-29, 2014.

SERENA C.; GILGADO F.; MARINÉ M.; PASTOR F. J.; GUARRO J. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of invasive Trichosporonosis. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, n.6, p. 2240-2243, 2006.

SERPA R. **Biofilmes de *Trichosporon asahii* e *Trichosporon inkin*: Aspectos Morfofisiológicos, sensibilidade a antifúngicos e inibição mediada por retronavir.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica, 2016. Rossana Aguiar Cordeiro, Orientadora.

SHAFIEI M.; PEYTON L.; HASHEMZADEH M.; Foroumadi A. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorg Chem.** v. 28, p. 104, 2020.

SILVESTRE A.J.M.; MIRANDA M.A.B.R.; CAMARGO Z.P. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a brazilian population. **Braz J Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 628-634, 2010.

SILVESTRE-JUNIOR A.M. **Sistemática molecular de *Trichosporon* spp. baseada em genes ribossomais e sua correlação com fatores de virulência e epidemiologia.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, 2009. Zoilo Pires de Camargo, Orientador.

SINGH S.; CAPOOR M.R.; VARSHNEY S.; GUPTA D.K.; VERMA P.K.; RAMESH V. Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Infections Caused by *Trichosporon* Species: An

Emerging Non-*Candida* and Non-*Cryptococcus* Yeast Worldwide. **Indian J Med Microbiol.** v. 37, n. 4, p. 536-541, 2019.

SNELDERS E.; HUIS IN 'T VELD R.A.; RIJS A.J.; KEMA G.H.; MELCHERS W.J.; VERWEIJ P.E. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. **Appl Environ Microbiol.**, v. 75, n. 12, p. 4053-4057, 2009.

SPANAMBERG A.; SANCHES E.M.C.; SANTURIO J.M.; FERREIRO L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 39, n. 1, 2009.

SPANAMBERG AD. **Fungos e bactérias em leite de ovelhas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2010. Laerte Ferreiro, Orientador.

SUGITA T.; NISHIKAWA A.; SHINODA T. Rapid detection of species of the opportunistic yeast *Trichosporon* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. 36(5): 1458-60, 1998.

SUGITA T.; TAKASHIMA M.; IKEDA R.; NAKASE T.; SHINODA T. Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *C. laurentii* clinical isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 1468-1471, 2000.

SUGITA T.; TAKASHIMA M.; NAKASE T.; ICHIKAWA T.; IKEDA R.; SHINODA T. Two new yeasts, *Trichosporon debeurmannianum* sp. nov. and *Trichosporon dermatis* sp. nov., transferred from the *Cryptococcus humicola* complex. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v.3, p. 1221-1228, 2001.

SUGITA T.; NAKAJIMA M.; IKEDA R.; MATSUSHIMA T.; SHINODA T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions on *Trichosporon* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1826-1830, 2002.

SUH S.O.; HOUSEKNECHT J.L.; GROSSO K.M.; CARRION M.E. Characterization of the medically important yeast *Trichosporon mucoides* and its close sister *Trichosporon dermatis* by traditional and advanced technologies. **J Med Microbiol.**, v. 64, n. 10, p. 1162-1143, 2015.

SUN W.; SU J.; XU S.; YAN D. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infection in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1750-1757, 2012.

SUZUKI K.; NAKASE K.; KIO T.; *et al.* Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. **European Journal of Haematology**, v. 84, p. 441-447, 2010.

TAKASHIMA M.; KURAKADO S.; CHO O.; KIKUCHI K.; SUGIYAMA J. SUGITA T. Description of Four *Apiotrichum* and two *CutaneoTrichosporon* species isolated from guano samples from bat-inhabited caves in Japan. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 70, n. 8, p. 4458-4469, 2020.

TAMURA N.K.; GASPARETTO A.; SVIDZINSKI T.I. Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. **Mycopathologia**, v. 156, n. 4, p. 269-272, 2003.

TANYILDIZ H.G.; YESIL S.; TOPRAK S.; CANDIR M.O.; SAHIN G. Two case presentations infected by *Trichosporon asahii* and treated with voriconazole successfully. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2015, p. 1-3, 2015.

TAVERNA C. G.; CÓRDOBA S.; MURISENGO A. O.; VIVOT W.; DAVEL G.; BOSCO-BORGEAT E. Molecular identification, genotyping and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. **Medical Mycology**, v. 52, p. 356-366, 2014.

TOKIMATSU I.; KUSHIMA H.; HASHINAGA K.; UMEKI K.; OHAMA M.; ISHII H.; KISHI K.; HIRAMATSU K.; KADOTA J. The prophylactic effectiveness of various antifungal agents against the progression of *Trichosporonosis* fungemia to disseminated disease in a neutropenic mouse model. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 29, n. 1, p. 84-88, 2007.

TREVIÑO M.; GARCÍA-RIESTRA C.; ARESES P.; GARCÍA X.; NAVARRO D.; SUÁREZ F.J.; LÓPEZ-DEQUIDT I.A.; ZARAGOZA O.; CUENCA-ESTRELLA M. Emerging



*Trichosporon asahii* in elderly patients: epidemiological and molecular analysis by the DiversiLab system. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 33, n. 9, p. 1497-1503, 2014.

TUMBARELLO M.; FIORI B.; TRECARICHI E.M.; POSTERARO P.; LOSITO A.R.; DE LUCA A.; SANGUINETTI M.; FADDA G.; CAUDA R.; POSTERARO B. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **Plos One**, v. 7, n. 3, 2012.

URS T.A.; KADIYALA V.; DEEPAK S.; KARTHIK M.K. Catheter associated urinary tract infections due to *Trichosporon asahii*. **J Lab Physicians**, v. 10, n. 4, p. 464-470, 2018.

VERWEIJ P.E.; HOWARD S.J.; MELCHERS W.J.; DENNING D.W. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. **Drug Resist Updat.**, v. 12, n. 6, 2009.

VUILLEMIN, P. *Trichosporum* et trichospories. **Arch. Parasit. Hum. Comp**, v. 5, p. 255-256, 1902.

WALSH T.L.; *et al.* Infection due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 44-66, 2004.

WANG D.; BAUDYS J.; BARR J.R.; KALB S.R. Improved Sensitivity for the Qualitative and Quantitative Analysis of Active Ricin by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Anal Chem.**, v. 88, n. 13, p. 6867-6872, 2016.

WATSON K.C.; KALLICHURUM S. Brain abscess due to *Trichosporon cutaneum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 191-193, 1970.

WILLIANSO M.; SAMARANAYAKE L.P.; MACFARLANE T.W. Phospholipases activity as criterion for biotyping *Candida albicans*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 24, n. 5, p. 415-417, 1986.

YANG Y.L.; LIU Y.W.; CHEN H.T.; TSAI M.S.; CHU W.L.; LO H.J. Genotype analysis based on intergenic spacer 1 sequences of *Trichosporon asahii* collected in Taiwan. **Med Mycol.**v. 51, n. 8, p. 880-883, 2013.

ZHUANG K.; RAN X.; DAI Y.; TANG J.; YANG Q.; PRADHAN S.; RAN Y. An Unusual Case of White Piedra Due to *Trichosporon inkin* Mimicking Trichobacteriosis. **Mycopathologia.**, v. 181, n. 11-12, p. 909-914, 2016.

## ANEXOS

**Anexo 01:** Coloração das colônias no meio cromogênico CHROMagar *Candida*® das amostras de *Trichosporon* isoladas de material humano, animal e ambiental.

| Amostra | Origem         | Coloração apresentada no meio cromogênico |
|---------|----------------|-------------------------------------------|
| 1       | Clínica Humana | Verde                                     |
| 2       | Clínica Humana | Verde                                     |
| 3       | Clínica Humana | Verde                                     |
| 4       | Clínica Humana | Verde                                     |
| 5       | Clínica Humana | Verde                                     |
| 6       | Clínica Humana | Verde                                     |
| 7       | Clínica Humana | Verde                                     |
| 8       | Clínica Humana | Verde                                     |
| 9       | Clínica Humana | Verde                                     |
| 10      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 11      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 12      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 13      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 14      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 15      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 16      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 17      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 18      | Clínica Humana | Azul/Roxo                                 |
| 19      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 20      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 21      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 22      | Clínica Humana | Roxo Escuro                               |
| 23      | Clínica Humana | Rosa Claro                                |
| 24      | Clínica Humana | Lilás                                     |
| 25      | Clínica Humana | Azul/Roxo                                 |
| 26      | Clínica Humana | Roxo esverdeado                           |
| 27      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 28      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 29      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 30      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 31      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 32      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 33      | Clínica Humana | Verde Claro                               |
| 34      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 35      | Clínica Humana | Roxo esverdeado                           |
| 36      | Clínica Humana | Roxo esverdeado                           |
| 37      | Clínica Humana | Roxo esverdeado                           |
| 38      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 39      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 40      | Clínica Humana | Azul Petróleo                             |
| 41      | Clínica Humana | Verde                                     |
| 42      | Clínica Humana | Azul Petróleo                             |
| 43      | Clínica Humana | Verde                                     |

Continuação...

*continuação*

| <b>Amostra</b> | <b>Origem</b>  | <b>Coloração apresentada no meio cromogênico</b> |
|----------------|----------------|--------------------------------------------------|
| 44             | Clínica Humana | Verde Azulado                                    |
| 45             | Clínica Animal | Verde                                            |
| 46             | Clínica Animal | Verde                                            |
| 47             | Clínica Animal | Verde                                            |
| 48             | Clínica Animal | Verde                                            |
| 49             | Ambiental      | Creme                                            |
| 50             | Ambiental      | Lilás                                            |
| 51             | Ambiental      | Creme                                            |
| 52             | Ambiental      | Creme                                            |
| 53             | Ambiental      | Creme                                            |
| 54             | Ambiental      | Verde                                            |
| 55             | Ambiental      | Verde                                            |
| 56             | Ambiental      | Creme                                            |
| 57             | Ambiental      | Roxo Claro                                       |
| 58             | Ambiental      | Roxo Claro                                       |
| 59             | Ambiental      | Creme                                            |

**Anexo 02:** Características fenotípicas das leveduras do gênero *Trichosporon* spp. isoladas de amostras humana, animal e ambiental.

| Amostra | Características Fenotípicas |              |        |                               |                       |
|---------|-----------------------------|--------------|--------|-------------------------------|-----------------------|
|         | Apressório                  | Artroconídio | Urease | Tolerância a<br>Cicloheximida | Crescimento a<br>37°C |
| 1       | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 2       | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 3       | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 4       | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 5       | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 6       | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 7       | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 8       | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 9       | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 10      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 11      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 12      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 13      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 14      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 15      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 16      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 17      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 18      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 19      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 20      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 21      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 22      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 23      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 24      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 25      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 26      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 27      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 28      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 29      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 30      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 31      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 32      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 33      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 34      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 35      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 36      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 37      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 38      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 39      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 40      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 41      | -                           | -            | +      | +                             | +                     |
| 42      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 43      | -                           | -            | +      | +                             | +                     |
| 44      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 45      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 46      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |
| 47      | -                           | +            | +      | +                             | +                     |

*Continua...*

...Continuação

| Amostra | Características Fenotípicas |              |        |                                       |                       |
|---------|-----------------------------|--------------|--------|---------------------------------------|-----------------------|
|         | Apressório                  | Artroconídio | Urease | Tolerância a<br>Cicloheximida<br>0,1% | Crescimento a<br>37°C |
| 48      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 49      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 50      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 51      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 52      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 53      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 54      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 55      | -                           | -            | +      | +                                     | +                     |
| 56      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 57      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 58      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |
| 59      | -                           | +            | +      | +                                     | +                     |

**Anexo 03** – Identificação convencional bioquímica das amostras de *Trichosporon* spp.: assimilação e fermentação de carboidratos.

| Amostra | Assimilação de Carboidratos – Auxanograma |           |          |         |         |           |            |          |          |         | Fermentação de Carboidratos – Zimograma |         |          |          |          |           |           |         | IDENTIFICAÇÃO*   |
|---------|-------------------------------------------|-----------|----------|---------|---------|-----------|------------|----------|----------|---------|-----------------------------------------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|---------|------------------|
|         | RAMNOSE                                   | MELIBIOSE | RAFINOSE | RIBITOL | XYLITOL | ARABINOSE | GALACTITOL | INOSITOL | SORBITOL | GLICOSE | LACTOSE                                 | MALTOSE | SACAROSE | TREALOSE | RAFINOSE | GALACTOSE | CELIBIOSE | GLICOSE |                  |
| 01      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 02      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 03      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 04      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 05      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 06      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 07      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 08      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 09      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 10      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 11      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 12      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 13      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |
| 14      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i> |

Continua...







| Amostra | Assimilação de Carboidratos – Auxanograma |           |          |         |         |           |            |          |          |         | Fermentação de Carboidratos – Zimograma |         |          |          |          |           |           |         |                         | IDENTIFICAÇÃO* |
|---------|-------------------------------------------|-----------|----------|---------|---------|-----------|------------|----------|----------|---------|-----------------------------------------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|---------|-------------------------|----------------|
|         | RAMNOSE                                   | MELIBIOSE | RAFINOSE | RIBITOL | XYLITOL | ARABINOSE | GALACTITOL | INOSITOL | SORBITOL | GLICOSE | LACTOSE                                 | MALTOSE | SACAROSE | TREALOSE | RAFINOSE | GALACTOSE | CELIBIOSE | GLICOSE |                         |                |
| 46      | -                                         | -         | -        | +       | +       | +         | -          | -        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. montevideense</i> |                |
| 47      | +                                         | -         | -        | -       | +       | +         | -          | -        | -        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. asahii</i>        |                |
| 48      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. coremiiforme</i>  |                |
| 49      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 50      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 51      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 52      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 53      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 54      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 55      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 56      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 57      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 58      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |
| 59      | +                                         | +         | +        | +       | +       | +         | +          | +        | +        | +       | -                                       | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | <i>T. mucoides</i>      |                |

\*Utilização de chaves taxonômicas: Rodriguez-Tudela *et al.*, (2005); Kurtzman, Fell & Boekhout (2011).

**Anexo 04** – Resultados de identificação de amostras de *Trichosporon* obtidos por meio de técnicas fenotípicas, Maldi Tof e técnicas moleculares.

| Amostras | Origem         | Identificação Fenotípica | Identificação Maldi Tof | Identificação Molecular   |                 |
|----------|----------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|
|          |                |                          |                         | Espécie                   | Identificação % |
| 1        | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 2        | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 3        | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 4        | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 5        | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 6        | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 7        | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 8        | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 9        | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 10       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 11       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 12       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 13       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 14       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 15       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 16       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 17       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 100             |
| 18       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. montevidense</i>  | <i>T. montevidense</i>    | 100             |
| 19       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.83           |
| 20       | Clínica Humana | <i>T. inkin</i>          | <i>T. inkin</i>         | <i>T. inkin</i>           | 100             |
| 21       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. coremiiforme</i>  | <i>T. coremiiforme</i>    | 100             |
| 22       | Clínica Humana | <i>T. mucoides</i>       | <i>T. mucoides</i>      | <i>C. dermatitis</i>      | 99.78           |
| 23       | Clínica Humana | <i>T. mucoides</i>       | <i>T. mucoides</i>      | <i>T. dermatitis</i>      | 99.79           |
| 24       | Clínica Humana | <i>T. mucoides</i>       | <i>T. mucoides</i>      | <i>T. dermatitis</i>      | 99.57           |
| 25       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. inkin</i>         | <i>T. veenhuisii</i>      | 100             |
| 26       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. inkin</i>         | <i>T. inkin</i>           | 100             |
| 27       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.83           |
| 28       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. inkin</i>         | <i>T. inkin</i>           | 100             |
| 29       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. inkin</i>         | <i>T. inkin</i>           | 99.66           |
| 30       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.33           |
| 31       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.49           |
| 32       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 98.45           |
| 33       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.67           |
| 34       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.83           |
| 35       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. inkin</i>         | <i>T. inkin</i>           | 100             |
| 36       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. inkin</i>         | <i>T. inkin</i>           | 100             |
| 37       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. inkin</i>         | <i>T. inkin</i>           | 99.83           |
| 38       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.83           |
| 39       | Clínica Humana | <i>T. japonicum</i>      | <i>T. inkin</i>         | <i>T. inkin</i>           | 100             |
| 40       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.83           |
| 41       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | Não identificado        | <i>T. asahii</i>          | 98.25           |
| 42       | Clínica Humana | <i>T. mucoides</i>       | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.83           |
| 43       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | Não identificado        | <i>T. asahii</i>          | 99.66           |
| 44       | Clínica Humana | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 98.38           |
| 45       | Clínica Animal | <i>T. faecale</i>        | <i>T. coremiiforme</i>  | <i>T. coremiiforme</i>    | 99.48           |
| 46       | Clínica Animal | <i>T. montevidense</i>   | Não identificado        | <i>T. insectorum</i>      | 99.83           |
| 47       | Clínica Animal | <i>T. asahii</i>         | <i>T. asahii</i>        | <i>T. asahii</i>          | 99.83           |
| 48       | Clínica Animal | <i>T. coremiiforme</i>   | Não identificado        | <i>Trichosporon</i> spp.  | 99.67           |
| 49       | Ambiental      | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 99              |

Continua...

Continuação...

| Amostras | Origem    | Identificação Fenotípica | Identificação Maldi Tof | Identificação Molecular   |                 |
|----------|-----------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|
|          |           |                          |                         | Espécie                   | Identificação % |
| 50       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 99.65           |
| 51       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 100             |
| 52       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 100             |
| 53       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 99              |
| 54       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 100             |
| 55       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 99              |
| 56       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 100             |
| 57       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 99.64           |
| 58       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 100             |
| 59       | Ambiental | <i>T. mucoides</i>       | Não identificado        | <i>T. debeurmannianum</i> | 100             |