

Henri Donnarumma Levy Bentubo¹
Walderez Gambale²
Olga Fischman¹

**Laboratorial
characterization and
chromogenic behavior
of yeasts of the genus
*Trichosporon***

| Caracterização laboratorial e comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*

ABSTRACT | Introduction: *The diagnosis of nosocomial fungal infections needs improvement to become faster. The phenotypic techniques are cheaper than other methods, however it is a waste of time. The currently available commercial systems allow the quick identification of a small number of medical important yeasts and its cost is generally more expensive. The CHROMagar Candida® (Difco®) medium, employed on Candida species differentiation, may represent an alternative to laboratorial characterization of emergent yeast species. Objective:* *The aim of this study was to evaluate the chromogenic behavior of Trichosporon species when cultured on CHROMagar Candida®, as a possible alternative method for yeasts identification.*
Methods: *Twenty-four Trichosporon isolates and four standard-strains were identified by classical phenotypic patterns and seeded on Petri dishes containing the chromogenic medium. The samples were incubated at 30° C for 72 hours. The phenotypic characteristics and pigment variations were carefully noted.*
Results: *According to phenotypic tests, the 24 isolates were classified as Trichosporon asabii (n = 12), T. inkin (n = 4) T. mucoides (n = 3) and T. ovoides (n = 5). Intraspecific pigment variations were observed. The colors vary between green to blue or bluish-green with non-pigmented marginal zone. Conclusion:* *The CHROMagar Candida™ was not able to provide the correct differentiation between the Trichosporon species studied.*

Keywords | *Trichosporon; Yeasts; Diagnostic; CHROMagar Candida™.*

RESUMO | Introdução: O diagnóstico de infecções fúngicas nosocomiais requer métodos rápidos e seguros. As técnicas fenotípicas, embora pouco dispendiosas, demandam muito tempo. Os sistemas comerciais disponíveis, atualmente, permitem a identificação rápida de um número restrito de leveduras de interesse médico, e seus custos são, geralmente, mais elevados. O meio de CHROMagar Candida® (Difco®), usado para a diferenciação de espécies de *Candida*, pode significar uma opção para a caracterização de espécies emergentes de leveduras. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento cromogênico de espécies de *Trichosporon*, quando semeadas em meio de CHROMagar Candida®, como uma alternativa possível para a identificação dessa levedura. **Métodos:** Vinte e quatro isolados clínicos e quatro cepas padrão foram identificados por métodos fenotípicos clássicos, semeados em placas de Petri, contendo o meio cromogênico e incubados à temperatura de 30°C, durante 72 horas. As características fenotípicas e pigmentação apresentadas foram cuidadosamente anotadas. **Resultados:** De acordo com a caracterização fenotípica, os 24 isolados foram caracterizados como: *Trichosporon asabii* (n=12), *T. inkin* (n=4), *T. mucoides* (n=3) e *T. ovoides* (n=5). Variações pigmentares intraespecíficas foram observadas. As cores variavam de verde a azul ou verde-azulada com zonas marginais não pigmentadas. **Conclusão:** O CHROMagar Candida® não foi capaz de proporcionar diferenciação entre as espécies de *Trichosporon* estudadas.

Palavras-chave | *Trichosporon; Leveduras; Diagnóstico; CHROMagar Candida®.*

¹Universidade Federal de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil.

² Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil.

INTRODUÇÃO |

A emergência de novos patógenos fúngicos, mas de grande importância médica, tem contribuído para o aumento da morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos¹. Pacientes com câncer, diabetes, transplantados de órgãos etc. constituem uma nova população de doentes, do fim do século XX e início do século XXI, que apresentam maior sobrevivência, devido a técnicas cirúrgicas mais agressivas, regimes terapêuticos com emprego de novos fármacos e diagnósticos mais aprimorados. Essa população da “nova era”, ao mesmo tempo em que atinge maior longevidade, também está mais sujeita às infecções oportunistas por patógenos fúngicos emergentes. Entre esses agentes microbianos, devem ser destacadas as espécies do gênero *Trichosporon*, identificadas como importantes agentes de infecção invasiva^{2,3,4}.

O gênero *Trichosporon* compreende inúmeras espécies que habitam diferentes nichos ecológicos naturais. Sugita *et al.*⁵ consideram *T. asabii* um microrganismo comum na natureza. O *Trichosporon* spp. pode ser encontrado em água, solo e superfície corpórea de humanos e animais^{6,7,8}. *Trichosporon asabii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* são considerados espécies que essencialmente ocupam nichos ecológicos não vertebrados, mas que possuem habilidade relativamente pronunciada de sobreviver em tecidos de organismos vertebrados, onde são capazes de desenvolver micoses oportunistas superficiais e profundas⁹. De Hoog¹⁰ estabeleceu, em seu trabalho, uma classificação do risco para essas infecções fúngicas em seres humanos e animais.

Além das infecções superficiais (piedra branca, dermatites e onicomicoses) com as quais o gênero *Trichosporon* pode ser relacionado, quadros de tricosporonose disseminada também têm sido observados. Esses casos de infecção invasiva são mais comuns em pacientes imunossuprimidos, como portadores da síndrome da imunodeficiência humana adquirida¹¹, transplantados de órgãos e tecidos¹² e aqueles com doenças hematológicas malignas¹³.

As espécies de *Trichosporon* isoladas de amostras clínicas estão associadas ao tipo de infecção: *T. inkin* e *T. ovoides*, agentes comuns da piedra branca da região crural e couro cabeludo, respectivamente; *T. asteroides* e *T. cutaneum* associados a lesões cutâneas; enquanto *T. asabii* e *T. mucoides* são mais frequentemente envolvidos em infecções invasivas, ressaltando-se a predominância de *T. asabii*¹⁴.

O gênero *Trichosporon* é caracterizado pela formação de artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas¹⁵. Morfológicamente, as espécies patogênicas são muito semelhantes e podem ser confundidas facilmente,

apresentando, às vezes, morfologia característica capaz de diferenciá-las. Essa diferenciação, ainda hoje, é realizada em muitas instituições médicas com o emprego das técnicas convencionais de diagnóstico que, apesar do baixo custo, necessitam de tempo para serem realizadas. Uma vez que, nesses casos de infecção oportunística, as intervenções terapêuticas necessitam ser instauradas com maior rapidez e especificidade, a identificação precoce do agente infeccioso se torna fundamental¹⁶.

O objetivo da presente pesquisa foi identificar isolados clínicos de *Trichosporon* spp. por meio das técnicas fenotípicas convencionais e avaliar o comportamento cromogênico dessas leveduras, quando semeadas em meio diferencial CHROMagar *Candida*[®] (Difco[®]), na tentativa de identificar um padrão específico na expressão fenotípica dos isolados em frente à assimilação dos cromógenos presentes nesse meio e, conseqüentemente, facilitar a realização e diminuir o tempo para o diagnóstico de infecções causadas por *Trichosporon* spp.

MÉTODOS |

Amostras estudadas

Foram incluídas na pesquisa 28 amostras clínicas de *Trichosporon* spp. mantidas na micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Unifesp-EPM. Vinte e quatro dessas amostras eram provenientes de casos humanos de simples colonização, infecção superficial e infecção profunda. Quatro das amostras utilizadas eram cepas padrão: *T. asabii* (CBS 2479), *T. inkin* (CBS 5585), *T. mucoides* (CBS 7625) e *T. ovoides* (CBS 7556), que foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Especial de Micologia (Unifesp/EPM) e foram empregadas como controles nas reações. Esse trabalho seguiu os parâmetros estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

Confirmação de gênero

Repiques de 24-72h, mantidos em ágar Sabouraud dextrose, foram submetidos ao teste de produção de urease em meio de ágar ureia de Christensen¹⁷ e teste de fermentação de carboidratos¹⁸. Cepas clínicas de *Cryptococcus neoformans* (ICB 162C) e *Candida albicans* (ICB 12A) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata.

Confirmação das espécies

A identificação das espécies de *Trichosporon* foi baseada na metodologia laboratorial clássica, que se fundamenta em testes morfológicos e bioquímicos^{9, 19}. Repiques de 24-72h foram semeados no centro de placas de Petri, contendo meio de ágar Sabouraud dextrose, e incubados a 30°C, durante 15 dias para a observação de colônias gigantes. A caracterização macromorfológica seguiu os critérios propostos por Guého *et al.*¹⁹. Todos os cultivos de *Trichosporon* spp. foram submetidos ao microcultivo em lâmina²⁰. Na prova de assimilação de compostos de carbono, foram empregadas: glicose, melibiose, L-arabinose, sorbitol e mio-inositol²¹. As amostras também foram avaliadas quanto à resistência a cicloheximida⁹. Os testes foram realizados em triplicata.

Comportamento cromogênico

Na busca e avaliação de métodos rápidos para a identificação de leveduras do gênero *Trichosporon*, foi utilizado meio de CHROMagar *Candida*[®] (Difco[®]) para a verificação do comportamento cromogênico das amostras e possível aplicação na diferenciação das espécies. A pigmentação produzida foi cuidadosamente anotada após período de incubação em meio cromogênico a 30° C por 72 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS |

Confirmação de gênero

Todos os 24 isolados testados e as amostras-padrão produziram a urease e não fermentaram carboidratos, como foi observado para os controles *Cryptococcus neoformans* (ICB 162C) e *Candida albicans* (ICB 12A), positivo e negativo, respectivamente. Também foram observados artroconídios, blastoconídios, pseudo-hifas e hifas verdadeiras em todos os isolados.

Confirmação das espécies

Os 24 isolados foram classificados em *Trichosporon asabii* (n=12), *T. inkin* (n=4), *T. mucoides* (n=3) e *T. ovoides* (n=5). Artroconídios, em forma de barril, foram observados tanto em *Trichosporon asabii* como *T. mucoides*. No entanto, este último também expressou conídios lateroterminais em

forma de clave na maior parte das amostras. Artroconídios cilíndricos mais alongados foram compatíveis com *T. inkin*. Já *T. ovoides* foram caracterizados pela presença de artroconídios cilíndricos curtos e elipsoides. Células apressórias foram observadas apenas nos isolados de *T. inkin*.

A coloração dos cultivos de *T. asabii* variou de branco a creme. Metade dos isolados apresentou superfície pulverulenta. Nenhum isolado demonstrou tonalidade acinzentada. *Trichosporon asabii* apresentaram textura rugosa de aspecto cerebriforme em todos os casos. Da mesma forma, pequena faixa plana compatível com uma zona marginal foi observada nesses isolados. Textura rugosa, de aspecto cerebriforme, seco e opaco, sem formação de zona marginal foram observadas nos cinco isolados identificados como *T. inkin*. Todos os isolados de *T. inkin* expressaram superfície pulverulenta. A coloração das amostras foi predominantemente branca. Textura lisa da colônia e aspecto úmido e brilhante, com ausência de substância farinácea superficial foi verificada em todos os isolados compatíveis com *T. mucoides*. A cor creme também predominou nessas amostras. As colônias de *T. ovoides* se apresentaram frequentemente planas e de textura lisa. O aspecto seco e opaco foi constante durante o período de incubação. A coloração creme foi predominante e todos os cultivos apresentaram zona marginal.

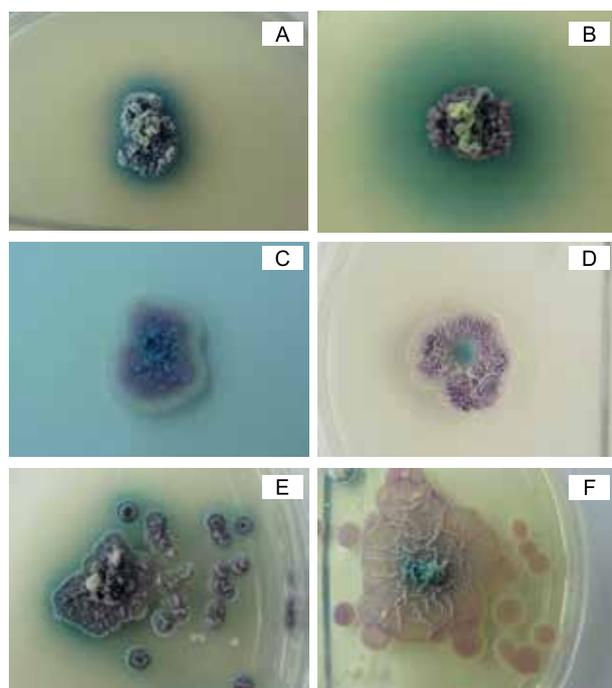
Isolados de *T. asabii* não assimilaram sorbitol, melibiose e myo-inositol; aqueles identificados como *T. inkin* assimilaram apenas myo-inositol; *T. mucoides* assimilaram todas as fontes de carbono; enquanto *T. ovoides* assimilaram fracamente a arabinose. Todos os isolados apresentaram crescimento em placas de Petri contendo meio acrescido de 0,1% de ciclo-heximida.

Comportamento cromogênico

Cultivos de *Trichosporon* spp. em meio de CHROMagar *Candida*[®] (Difco[®]) evidenciaram coloração verde-azulada, tonalidades de lilás e zona marginal não pigmentada. A amostra padrão (CBS 2479) e uma das amostras clínicas de *T. asabii* revelaram colônias azuis com centro lilás e colônias lilás e centro verde, após 72 horas de incubação. Amostra padrão de *T. inkin* (CBS 5585) expressou colônias azuis com centro verde. Os isolados de *T. mucoides* (CBS 7625) exibiram colônias que variavam de azul a lilás com centro verde. Cultivos de *T. ovoides*, incluindo a amostra padrão (CBS 7556) demonstraram coloração azulada da colônia. O comportamento cromogênico de *Trichosporon* spp. pode ser visualizado na Figura 1.

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

Figura 1 – Comportamento cromogênico de amostras de *Trichosporon* spp. em meio de CHROMagar *Candida*®



DISCUSSÃO |

O diagnóstico precoce e preciso de infecções fúngicas é especialmente importante no caso de pacientes imunocomprometidos^{15,22}. A identificação microbiológica clássica de fungos, baseada em características morfológicas e fisiológicas, constitui a maneira mais simples de identificar esses microrganismos, sendo adotada pela grande maioria dos pesquisadores na área^{10, 19, 23, 24, 25}.

Em virtude de possuírem parede celular multilamelar e septos tipo doliporo, *Trichosporon* spp. são classificados entre os *Basidiomycetes*. A produção de urease foi importante na diferenciação entre *Trichosporon* spp. e *Geotrichum* spp.; enquanto a fermentação de carboidratos distingue

Trichosporon spp. de *Candida* spp., uma vez que esses gêneros podem revelar características comuns^{10, 19, 24, 26}.

Trichosporon beigelli era a única espécie reconhecida até pouco tempo. Hoje, sabe-se que essa designação passou a ser considerada não válida^{19, 23}. A partir dos estudos taxonômicos de Ghêho et al.^{19, 23, 26}, hoje adotados por outros pesquisadores, espécies do complexo *Trichosporon* foram incluídas na taxonomia fúngica¹⁰.

As diferentes espécies de *Trichosporon* spp. possuem coloração que pode variar de branco a creme ou amarelo-acinzentado e aspecto pregueado, com superfície irregular composta por fissuras de diferentes profundidades e direções, que se distribuem sobre a superfície das colônias^{10,16,24}. A maior parte dos isolados apresentou textura rugosa e aspecto seco e opaco em temperatura de 30°C, confirmando os achados de outros pesquisadores²³. Cultivos de crescimento predominantemente plano, como *T. mucoides* e *T. ovoides*, podem ser mais facilmente confundidos com leveduras não *Trichosporon* do que *T. asabii* e *T. inkin*. Aspecto cerebriforme e pulverulento foi observado nos isolados *T. asabii* e *T. inkin*, que caracteristicamente a apresentam. A coloração branca foi prevalente entre isolados superficiais e profundos, com o que discordam autores que acreditam que a coloração acinzentada possa estar relacionada com cepas mais virulentas e agentes de processos invasivos^{10, 23, 24, 27}.

A formação de artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas é característica do gênero *Trichosporon*. Todas as amostras expressaram essas características relatadas previamente por outros autores^{10, 15, 23, 24}. Artroconídios em forma de barril são característicos tanto de isolados de *T. asabii* como de *T. mucoides*. Este último pode ainda ser diferenciado do primeiro pela produção de segmentos terminais e, por vezes, ramos laterais diferenciados, denominados por outros autores como clavados^{10,23}. *Trichosporon inkin* e *T. ovoides* parecem expressar melhor distinção por meio de sua macromorfologia do que micromorfologicamente. Ambos apresentam artroconídios cilíndricos. No entanto, diferenças sutis, principalmente em relação ao comprimento dos artroconídios, podem ser notadas. *Trichosporon inkin* tem artroconídios cilíndricos mais alongados e retos, além de conídios laterais simples, enquanto *T. ovoides* expressa artroconídios curtos e discretamente abaulados. Foram observadas células apressórias somente em cultivos de *T. inkin*, o que discorda da literatura, que menciona a sua presença também em *T. ovoides*¹⁰. Células apressórias são caracterizadas por modificação morfológica em segmentos terminais ou intercalares nas hifas do fungo, facilmente distinguíveis, por isso sua ausência, neste caso,

poderia estar associada a características individuais dos isolados. Talvez um maior número de isolados pudesse evidenciar melhor a presença dessas estruturas.

O número de fontes de carbono sugerido para o desempenho dos testes de assimilação de fontes de carbono varia conforme o número de espécies que se deseja identificar. Segundo De Hoog *et al.*⁹, as espécies de *Trichosporon* que apresentam importância médica podem ser diferenciadas pela assimilação de quatro fontes de carbono (glicose, L-arabinose, sorbitol, melibiose e mio-inositol). Contudo, é importante ressaltar que a suspensão na qual o fungo é diluído para a realização dos testes de assimilação requer inóculo concentrado e filtragem em oito camadas de gaze esterilizada, a fim de se evitar grumos na placa, o que atrapalha a formação dos halos e dificulta a sua visualização, como se pôde verificar em testes pilotos realizados anteriormente em nossos laboratórios. A visualização dos halos de assimilação foi facilitada pela espessura do meio de cultura empregado (aproximadamente meio milímetro).

O estabelecimento do diagnóstico de infecções fúngicas nosocomiais pode ser difícil, justificando a necessidade de métodos mais rápidos e seguros. CHROMagar *Candida*[®] é um meio composto por substratos cromogênicos, que permite diferenciar as espécies de *Candida* capazes de assimilar esses cromógenos e, conseqüentemente, expressar cores variadas. Os sistemas comerciais disponíveis atualmente permitem a identificação rápida de um número restrito de leveduras de interesse clínico e, geralmente, a custos bastante elevados. O meio CHROMagar *Candida*[®] já foi testado, experimentalmente, para a diferenciação de *Saccharomyces cerevisiae*, que expressou coloração púrpura; e *Trichosporon beigelli* ao qual os autores atribuíram coloração azul intensa³. No entanto, esses achados não podem ser considerados, uma vez que o gênero foi desmembrado em várias novas espécies que necessitam ser diferenciadas.

É possível distinguir as colônias de *Candida* spp. pela pigmentação que produzem: *C. albicans* produz coloração esverdeada, *C. tropicalis* apresenta coloração azulada e *C. krusei* uma cor que varia do branco-rosado ao rosa. Nesta investigação, todas as espécies de *Trichosporon* em meio de CHROMagar *Candida*[®] apresentaram comportamento cromogênico que não permitiu a sua identificação. Inicialmente, as colônias eram verdes e, posteriormente, tornavam-se azuis ou lilás, independentemente da espécie. Dessa forma, CHROMagar *Candida*[®] não parece ser uma alternativa promissora para a diferenciação de espécies de *Trichosporon*, uma vez que não há diferença entre as colorações expressas pelas diferentes amostras identificadas, como foi possível observar em relação a outras espécies de *Candida* que não aquelas já diferenciadas nesse meio³.

CONCLUSÃO |

Com base nos resultados encontrados nesta pesquisa, foi possível concluir que as leveduras do gênero *Trichosporon* apresentam características fenotípicas e bioquímicas que, quando criteriosamente analisadas, podem diferenciar as espécies mais comuns em nosso meio. Apesar de mais demorados, os métodos clássicos de identificação laboratorial de leveduras patogênicas ainda são mais eficientes do que os meios comerciais cromogênicos para diferenciação das espécies de *Trichosporon*. Sendo assim, não recomendamos o uso de CHROMagar *Candida*[®] para a caracterização laboratorial de *T. asabii*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides*. Contudo, novas investigações, com maior número de amostras e maior diversidade de espécies, devem ser realizadas, a fim de que se possa caracterizar melhor o comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*.

AGRADECIMENTOS |

Ao CNPq e à Fapesp pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS |

- 1 - Fischer L, Sterneck M. Invasive fungal infections in patients after liver transplantation. *Mycoses*. 2005; 48:27-35.
- 2 - Girmenia C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:1818-28.
- 3 - Giusiano GE, Mangiaterra M, Rojas F, Gómez V. Yeasts species distribution in neonatal intensive care units in northeast Argentina. *Mycoses*. 2004; 47:300-3.
- 4 - Silva JO, Candido RC. Avaliação do sistema API 20 C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 ;38:261-3.
- 5 - Sugita T, Nishikawa A, Ichikawa T, Ikeda R, Shinoda T. Isolation of *Trichosporon asabii* from environmental materials. *Med Mycol*. 2000; 38:27-30.
- 6 - Herbrecht R, Koenig H, Waller J, Liu KL, Guého E. *Trichosporon* infections: clinical manifestations and treatment. *J Mycol Méd*. 1993; 3:129-36.

- 7 - Kaplan W. Piedra in lower animals; a case report of white piedra in a monkey and a review of literature. *J Am Vet Med Assoc.* 1959; 134:113-7.
- 8 - Martins-Diniz JN, da Silva RAM, Miranda ET, Mendes-Giannini MJS. Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit. *Rev Saúde Pública.* 2005; 39:398-405.
- 9 - De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueiras MJ. Atlas of clinical fungi. 2 ed. Utrecht & Réus: Centralbureau Voor Schimmelcultures to Universitat Rovira; 2000.
- 10 - De Hoog GS. Risk assessment of fungi reported from humans and animals. *Mycoses.* 1996; 39:407-17.
- 11 - Coppola S, Angarano G, Montagna MT, Congedo P, Bellisario A, Monno L et al. *Trichosporon beigelli* infection in aids patients undergoing antifungal prophylaxis – report of two cases. *J Micol Méd.* 1993; 3:169-71.
- 12 - Moretti-Branchini ML, Fukushima K, Schoreiber AZ, Nishimura K, Papaiordanou PM, Trabasso P, Tanaka R, Miyaji M. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001; 39:161-4.
- 13 - Meyer MH, Letscher-Bni V, Waller J, Lutz P, Marcellin L, Herbrecht R. Chronic disseminated *Trichosporon asabii* infections in a leukemic child. *Clin Infect Dis.* 2002; 35:22-5.
- 14 - Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T. Taxonomic position of deep-seated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from trichosporonosis patients. *J Med Microbiol.* 1995; 33:1368-70.
- 15 - Cox GM, Perfect JR. *Cryptococcus Neoformans* var. *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon species*. In: Ajello L, Hay RJ. Topley & Wilson's: Microbiology and Microbial Infections. 9 ed. London: Oxford University Press; 1999.
- 16 - Yamamoto K, Makimura K, Sudo T, Shibuya K, Uchida K, Yamaguchi H. Experimental disseminated trichosporonosis in mice: tissue distribution and therapy with antifungal agents. *J Med Vet Mycol.* 1997; 35:411-8.
- 17 - Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *proteus* and *paracolon* cultures from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol.* 1946; 52:461-6.
- 18 - Wickerham L.J. Taxonomy of yeasts. U S Dept Agric Tech Bull. 1951; 1029: 1-56.
- 19 - Guého E, Smith MT, de Hoog GS, Billon-Grand G, Christen R, Batenburg-Van der Veget WH. contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Ant Leeuwenhock.* 1992; 61:289-316.
- 20 - Porto E, Takahashi N, Heins EM, Lacaz CdaS. Mieno método para microcultivo de hongos. *Rev Argent Micol.* 1981; 4:24-9.
- 21 - Lodder J, Kreger Van-Rij NJW. The yeasts: a taxonomic study. 2 ed. Amsterdam: North-Holland; 1970.
- 22 - Anaissie E, Gokaslan A, Hachem R, Rubin R, Griffin G, Robinson R et al. Azole therapy for trichosporonosis: clinical evaluation of eight patients, experimental therapy for murine infection, and review. *Clin Infect Dis.* 1992; 15:781-7.
- 23 - Guého E, Improvisi L, de Hoog GS, Dupont B. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses.* 1994; 37:3-10.
- 24 - Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts, a taxonomic study. 4 ed. Amsterdam: Elsevier; 1998.
- 25 - Lacaz CdaS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, de Melo NT. Leveduras de interesse médico. In: Lacaz CdaS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, de Melo NT. Tratado de micologia médica Lacaz. 9 ed. São Paulo: Savier; 2002.
- 26 - Guého E, Improvisi L, Christen R, de Hoog GS. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. *Ant Leeuwenhoek.* 1993; 63:175-89.
- 27 - Walsh TJ, Newman KR, Moody M, Wharton RC, Wade JC. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. *Medicine.* 1986; 65:268-79.

Correspondência para / Reprint request to:
Henri Donnarumma Levy Bentubo
Rua Doutor Gomes Ferraz, 176.
São Paulo - SP
Cep.: 02920-110.
E-mail: hbentubo@yahoo.com.br

Recebido em: 15-12-2012
Aceito em: 14-5-2013