



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“DIVERSIDAD MORFOLÓGICA Y SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA
POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO EN
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Trichosporon spp*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

SANDRA GUADALUPE MENDOZA ARANDA



México, D. F., Ciudad Universitaria 2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Jefe del laboratorio Dr. Rubén López Martínez.

Instituciones que colaboraron:

Unidad de Investigación Médica en Dermatología y Micología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional, Siglo XXI. Jefe Dr. Luis Javier Méndez Tovar.

Servicio de Medicina Interna. Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”
ISSSTE





Este trabajo va dedicado a....

Mis padres, Tere y Juan, por que a pesar de todo siempre me han apoyado y brindado amor, y sobre todo comprensión....

Mi abuelita Margarita, que aunque hace mucho ya no esta físicamente, nunca se ha ido de mi lado y es la que me ha dado la fuerza y cuidado para poder seguir con esta historia.

Mis hermanos, y a la vez grandes amigos, Juan, Pepe, Abi y Daniel por su amor y apoyo....

Mi prima, Jannette, que ha sido un gran ejemplo y me ha proporcionado valioso apoyo cuando más lo he necesitado....

Miguel Angel Arzola, por que el fue una persona muy importante que siempre ha estado conmigo e hizo que esto se volviera realidad....





Le doy gracias a....

*La Universidad Nacional Autónoma de México,
Mi casa, por haberme formado profesionalmente y
mostrarme lo valiosa que es la vida universitaria*

*La Doctora Patricia Manzano Gayosso, por todo
el conocimiento que me transmitió, así como apoyo
y sobretodo paciencia que me tuvo....*

*El profesor Alejandro Bonifaz por haberme iniciado
en el interesante mundo de la Micología....*

*Mis amigos que durante toda la carrera tuvieron mucho
que ver para que esta fuera inolvidable, Noemí, Cris,
Elena, Karina, Angel, Mitzi, Iván, Ulises, Jorge,
Abi, Memo, Angel 1/2, Lencho, Val....*

*Las valiosas compañeras del Laboratorio de Micología por
su apoyo y amistad, Rosita, Elda, Tony, Erika, Elba y Blanca....*

Gracias...



INDICE

página

I. Introducción

1.1 Planteamiento del problema.....	8
1.2 Hipótesis.....	9
1.3 Objetivos generales.....	10
1.3.1 Objetivos particulares.....	10

II. Antecedentes

2.1 Datos históricos.....	11
2.2 Hábitat natural.....	11
2.3 Taxonomía: Género y especies de <i>Trichosporon</i>	12
2.4 Identificación de <i>Trichosporon</i>	15
2.4.1 Características macroscópicas y microscópicas.....	15
2.4.2 Características fisiológicas.....	16
2.4.3 Características diferenciales con otros géneros.....	17
2.5 Manifestaciones clínicas.....	18
2.5.1 Infecciones superficiales.....	18
2.5.2 Infecciones diseminadas o sistémicas.....	22
2.5.3 Relación entre especies de <i>Trichosporon</i> y localización de la micosis.....	23
2.6 Antifúngicos y Mecanismo de acción.....	23
2.6.1 Polienos: Anfotericina B.....	24
2.6.2 Azoles.....	24
2.6.3 Alilaminas: Terbinafina.....	25
2.7 Mecanismos de Resistencia Antifúngica.....	26
2.7.1 Antecedentes de resistencia antifúngica de las especies de <i>Trichosporon</i>	27
2.8 Pruebas de Sensibilidad Antifúngica.....	28
2.8.1 Método de Microdilución en caldo.....	28





III. Material y Método.....	30
IV. Resultados.....	40
Tablas y gráfica.....	43
Imágenes.....	51
V. Discusión.....	60
VI. Conclusiones.....	63
VII. Bibliografía.....	64
VIII. Apéndice.....	71
IX. Anexos.....	72
9.1 Medios de cultivo.....	72
9.2 Técnicas de laboratorio.....	76



I. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Trichosporon, es una levadura de amplia distribución en la naturaleza, forma parte de la microbiota normal de la boca, piel y uñas. Desde 1992, se describieron 34 especies, de las cuales 7 han sido relacionadas como causantes de micosis en el humano, principalmente de infecciones superficiales como la “piedra blanca” en individuos inmunocompetentes. De las 7 especies *Trichosporon cutaneum* y *Trichosporon inkin* están asociadas a infecciones superficiales; mientras que *Trichosporon asahii* con infecciones profundas o diseminadas en pacientes inmunosuprimidos. Recientemente ha sido reportado una pobre respuesta a las diversas drogas antifúngicas en los pacientes con tricosporonosis diseminada, y una alta mortalidad en quienes han sido tratados con anfotericina B (AMB); algunos estudios han demostrado que *T. asahii* presenta resistencia frente a antifúngicos como AMB y 5 – fluorocitocina.

En México se han descrito algunos estudios de infecciones superficiales causadas en la mayoría de los casos por *Trichosporon* sp. y en algunos *Trichosporon beigelii*. En la actualidad el nombre de esta especie está en desuso y ha sido sustituida por *T. cutaneum*.

En nuestro país se desconoce la frecuencia y la distribución de las micosis causadas por las diferentes especies de esta levadura, así como las formas clínicas que causan. Además no existen trabajos en la literatura nacional sobre el patrón de sensibilidad antifúngica. Es importante conocer estos aspectos, debido a que es una levadura emergente y además la resistencia que ha mostrado alguna de la especies frente a AMB. Por lo tanto, es necesaria la identificación de las especies del agente causal, la elaboración de estudios de sensibilidad antifúngica *in vitro* para evaluar la actividad de las diferentes drogas frente a las especies de *Trichosporon*, para determinar las especies resistentes y finalmente establecer un tratamiento temprano y oportuno.



1.2 HIPÓTESIS

Trichosporon cutaneum será la principal especie identificada como causante de infecciones superficiales.

El morfotipo predominante estará caracterizado por las colonias rugosas, amarillentas y glabras.

Anfotericina B mostrarán menor actividad sobre las especies de *Trichosporon*.

Voriconazol tendrá la mayor actividad sobre las diferentes especies de *Trichosporon*.



1.3 OBJETIVOS GENERALES

- ✓ Identificar la especie de los aislamientos clínicos de *Trichosporon*.
- ✓ Determinar el patrón de sensibilidad en aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp. frente a diferentes antifúngicos mediante el método de microdilución en caldo.

1.3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de cada uno de los aislados de *Trichosporon*.
- Identificar las diferentes especies de *Trichosporon* por su patrón de asimilación de carbohidratos.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada antifúngico, con respecto al 80% de inhibición de crecimiento.
- Conocer la frecuencia de resistencia de las especies de *Trichosporon* a ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, anfotericina B y terbinafina.



II. ANTECEDENTES

2.1 Datos históricos de *Trichosporon*.

Este hongo fue descrito por Beigel en 1865 al observar nódulos blancos adheridos al pelo de una peluca, por lo que le denominó como “hongo del moño”. Rabenhorst, en 1867 acuñó el nombre binomial *Pleurococcus beigelii*. Behrend, en 1890 creó el género *Trichosporon*. Vuillemin, en 1902 observó nódulos en el pelo del bigote de un paciente y aisló un hongo levaduriforme al cual le denominó *Trichosporon beigelii*. Paul Horta en 1911, clasificó a las piedras en dos tipos: Piedra negra y Piedra blanca, esta última entidad causada por *T. beigelii*.^[41]

2.2 Hábitat Natural

La palabra *Trichosporon* es derivada del griego y representa la combinación de *Trichos* que significa pelo, con *sporon* que significa esporas.

Trichosporon es una levadura de amplia distribución en la naturaleza, comúnmente se aísla de suelo, de agua en zonas tropicales, algunos vegetales y aves. Esta levadura es un comensal en el humano, formando parte de la microbiota normal de la boca, piel y uñas.^[42]

Algunos autores reportan que la piel del humano, en el área perigenital, puede estar colonizada por *Trichosporon* spp. La incidencia que se ha calculado es de 12.4%, la cual se modifica de acuerdo con la edad, sexo y la raza del individuo.^[10]

Stenderup, *et al*,^[46] en 1986, describieron una frecuencia del 13% en los aislamientos de *Trichosporon* spp. de la región anal y la piel del escroto en hombres homosexuales.



2.3 Taxonomía: Género y especies de *Trichosporon*

De acuerdo con la propuesta del género *Trichosporon* dada por Behrend en 1890, se realizaron estudios posteriores en donde la ubicación taxonómica de esta levadura, es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum (Tipo o División): *Basidiomycota*

Subphylum (Subdivisión): *Basidiomycotina*

Orden: *Sporidiales*

Familia: *Sporidiobolaceae*

Género: *Trichosporon*

Hasta hace algunos años, los aislados de *Trichosporon* eran designados como *T. beigellii* o *T. cutaneum*. En 1992, Guého *et al*,^[15] realizaron una revisión taxonómica del género *Trichosporon* en donde utilizaron las características morfológicas, ultraestructurales y fisiológicas, así como contenido en G+C ADN, reasociación de ADN – ADN y secuenciación de bases de 26S rARN. Este estudio fue realizado en 101 aislamientos de diversas fuentes, en donde 19 especies fueron diferenciadas^[1]. Posteriormente Sugita, *et al*,^[48] en 1995, mediante técnicas moleculares estudiaron diez aislados de *T. cutaneum* provenientes de infecciones profundas, empleando la técnica de reasociación de ADN – ADN, e identificaron nueve de los aislados como *T. asahii* y uno *T. ovoides*. Este descubrimiento sugirió que *T. cutaneum* es una especie heterogénea, y que el agente causante de la tricosporonosis es debido a cuatro o más especies. Hasta entonces se habían descrito 19 especies, pero con el nuevo descubrimiento se adicionaron 15 especies más que fueron identificadas con la técnica de análisis de secuencia de ADN de la transcripción interna por intervalos (ITS) y/o por las regiones D1/D2 de la subunidad larga (26S) del gen rRNA.^[1]



Actualmente se conocen 34 especies incluidas en el género *Trichosporon*, de las cuales *Trichosporon asahii*, *T. mucooides*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. ovoides* y *T. loubieri*, son los principales causantes de infecciones superficiales y diseminadas en el humano.^[1, 9] De estas, las especies

involucradas en las infecciones profundas son *T. asahii* y *T. mucoides*, mientras que *T. asteroides*, *T. ovoides* y *T. cutaneum* son responsables de la “piedra blanca” y otras infecciones superficiales. La sexta especie, *T. inkin* ha sido aislada en infecciones superficiales y diseminadas. Recientemente Moylett *et al*,^[7] adicionaron *T. pullulans* a la lista de patógenos oportunistas de las especies de *Trichosporon*.

En la descripción filogenética, obtenida por análisis de los segmentos D1/D2, realizado por Díaz, *et al*,^[9] en las especies de *Trichosporon*, dando como resultado cuatro clados: Gracile, Cutaneum, Porosum y Ovoides; en este último se presentan la mayoría de las especies clínicamente relevantes: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. ovoides* y *T. inkin*. En el clado Cutaneum se encuentran *T. mucoides* y *T. cutaneum*; la séptima especie *T. loubieri* que esta ubicado en la rama de Gracile, es una levadura que habita en el suelo y que es potencialmente oportunista (Figura 1).



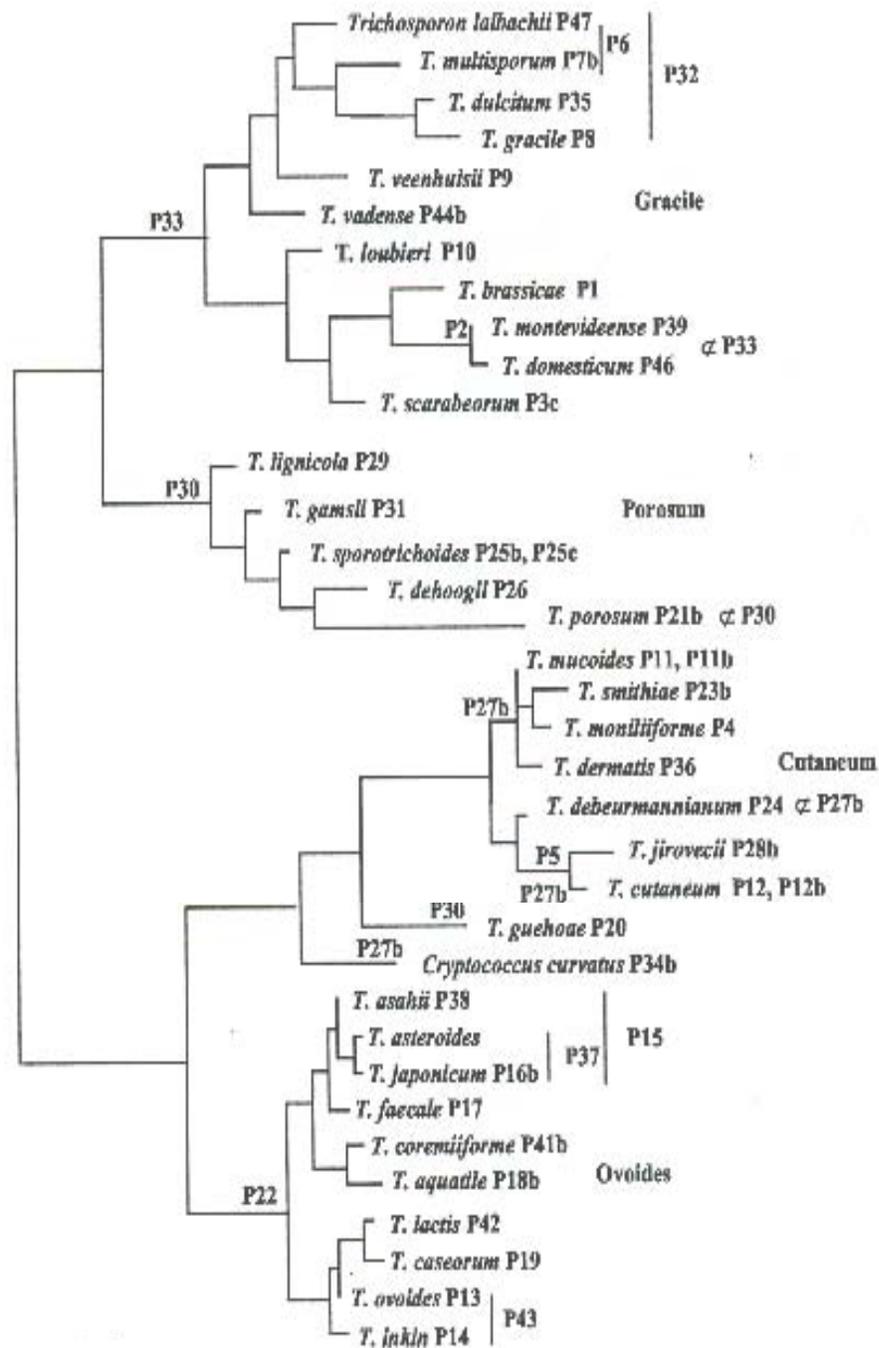


Fig. 1 Árbol filogenético de las especies de *Trichosporon*.

Tomado de Díaz, et al, [9] 2004.



2.4 Identificación de *Trichosporon*

2.4.1 Características Macroscópicas y Microscópicas

Las colonias de *Trichosporon* presenta variabilidad morfológica y algunas son parecidas a levaduras del género *Candida*. Estas colonias pueden ser lisas, rugosas, algunas aterciopeladas, glabras, con el transcurso del tiempo toman un aspecto cerebriforme, en encajes, con el centro ligeramente elevado, a menudo se presentan grietas en el medio de cultivo y alrededor de las colonias. La tonalidad de las colonias va de blanco, crema y amarillento. [41, 42]

Desde el punto de vista microscópico este género se caracteriza por la formación de artroconidios de 3-4µm de diámetro, la mayoría con extremos redondeados; la presencia de blastoconidios ovalados y redondos, de un diámetro de 3-6µm. Para valorar la variación en la morfología microscópica se han utilizado dos medios de cultivo: Agar Harina de Maíz (AHM) y agar extracto de malta (AEM). En AHM se le adicionó Tween 80 al 1%, y una vez inoculado este medio de cultivo se incubaba a 25°C por 48 horas; microscópicamente se observa la presencia de abundantes pseudohifas y filamentos septados hialinos que se fragmentan en artroconidios ovales o rectangulares, en algunos de esos filamentos se presentan un conidio terminal. En AEM al 2%, después de 48 horas de incubación a 28°C se observan abundantes artroconidios. Por microscopía electrónica se han descrito la formación de septos hifales con doliporos y parentesomas típicos de la división *Basidiomycota*. [7, 41, 50]

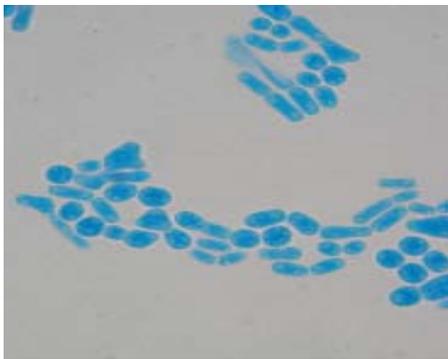


Figura 2. *Trichosporon* sp. 100X



Figura 3. Colonias de *Trichosporon* sp



Las especies del género *Trichosporon* sólo presentan una fase de reproducción asexual o anamorfa.

2.4.2 Características Fisiológicas

Para la identificación del género y especies de *Trichosporon* se realizan diferentes pruebas fisiológicas:

1. Hidrólisis de urea, en el medio Christensen, cuyo fundamento es que estas levaduras poseen una enzima denominada ureasa. La levadura utiliza nitrógeno proveniente del sustrato base del medio de Christensen (urea); hidrolizan la urea y liberan amoníaco y dióxido de carbono. Este metabolito alcaliniza el medio haciendo virar el indicador rojo de fenol, de tal manera que el medio pasa de amarillo a rojo.
2. Termotolerancia creciendo las levaduras en agar dextrosa Sabouraud e incubando a temperaturas de 30 y 37°C durante 48 horas.
3. Crecimiento en presencia de cicloheximida, la cual también es diferencial de especie. ^[44]
4. Asimilación de carbohidratos, esta prueba también sirve para diferenciar las especies de este género. Las características bioquímicas se muestran en la tabla 1. ^[5]
5. Algunos investigadores emplean el medio de cultivo CHROMagar para identificar este agente, dado que las colonias de *Trichosporon* muestran una coloración azul, membranosa y seca, características diferenciales con otros géneros. ^[55]



Figura 4. *Trichosporon* en CHROMagar *Candida*



Tabla 1. Patrón de asimilación de carbohidratos para la identificación de especies de *Trichosporon*.

Azúcares	<i>T. asahii</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. inkin</i>	<i>T. mucoides</i>	<i>T. ovoides</i>
D – glucosa	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+
Sacarosa	+/-	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
D – galactosa	+	+	+/-	+	+
Rafinosa	-	+/-	-	+	+/-
L – arabinosa	+	+	-	+	-
Sorbitol	-	+	-	+	V
Melodiosa	-	+	-	+	-
Myo-inositol	-	+	+	+	-
37°C	+	-	+	+	V
0.1% cicloheximida	+	-	V	+	+

(Barnett JA, *et al.* [5] 2000)

2.4.3 Características diferenciales con otros géneros

Este género es comúnmente comparado con el género *Candida* y *Geotrichum* pero difiere en algunos aspectos morfológicos y fisiológicos que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Algunas pruebas para la identificación del género *Trichosporon*

Prueba Género	Urea	Morfología microscópica	Morfología macroscópica	Fermentación	Reducción de nitratos	Crecimiento con cicloheximida
<i>Trichosporon</i>	+	Blastoconidios y artroconidios	Colonias membranosas, blanco – amarillentas, aspecto variable.	+	-	+
<i>Candida</i>	-	Blastoconidios	Colonias cremosas blanco – amarillentas, lisas y brillosas	+	-	Varia dependiendo de la especie
<i>Geotrichum</i>	-	Artroconidios	Colonias céreas y rugosas de color blanco – grisáceo	+	-	+
<i>Cryptococcus</i>	+	Blastoconidios. Cápsulas	Colonias mucoides color blanco – amarillento, rosado, poco elevadas	±	±	-

+ = el carácter esta presente - = el carácter esta ausente ± = el carácter es raro, pero puede ser positivo en algunas especies



2.5 Manifestaciones clínicas

2.5.1 Infecciones Superficiales

Durante varios años se consideraba a *Trichosporon beigelii* como la única especie causante de “Piedra blanca”. [41]

La piedra blanca, es una infección fúngica del tallo piloso, caracterizada por nódulos firmes e irregulares, de 1 a 2mm de diámetro, de color blanco – amarillento, a marrón claro. Estos nódulos se mantienen adheridos a cualquier sitio a lo largo del tallo piloso, por una sustancia cemento. Predominan en el extremo distal del pelo. La piel cabelluda es afectada con menor frecuencia, en comparación con la afección a otras regiones pilosas como pelo del pubis y axilas; otras menos comunes es el pelo de la barba, bigote, cejas y pestañas.

La enfermedad suele estar relacionada con una higiene corporal descuidada. La infección se produce sobre la vaina o cutícula del pelo, de tal manera que la levadura puede desarrollarse hacia adentro y sobre todo el tallo, para formar concreciones espaciadas de manera irregular a lo largo de su eje. El pelo se debilita y puede romperse en esa región. El desarrollo puede presentarse en forma de manguito suave de hifas entretrejidas, fragmentándose para formar artroconidios. A medida que el pelo va saliendo del folículo se inicia rápidamente la infección, formando un gránulo que va endureciéndose. En ésta, como en otras infecciones superficiales, no hay patología ni respuesta inflamatoria (Figura 5). [4, 6, 23, 41]

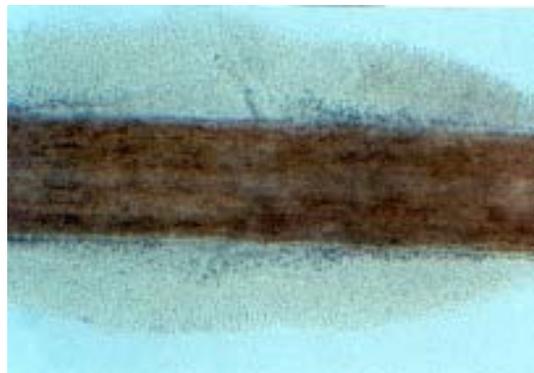


Figura 5. Piedra blanca



Recientemente se han descrito otras infecciones superficiales causadas por *Trichosporon* sp., en la tabla 4 se resumen los casos de onicomicosis y en la tabla 5 los casos de intertrigo de pies y otras dermatomicosis que simulan eczemas, manchas purpúricas. La onicomicosis y el intertrigo de pies, generalmente relacionados a pacientes inmunocompetentes.

ONICOMICOSIS

En la onicomicosis se ven afectadas las uñas de los pies y en algunas ocasiones las de las manos, la distrofia ungueal está caracterizada por paroniquia, es decir eritema alrededor de la uña y edema doloroso. La infección crónica afecta el crecimiento de la uña, produciendo surcos transversales y longitudinales (Figura 6). La uña toma un color amarillento y con frecuencia se presenta onicólisis (desprendimiento distal de la uña).^[23] El primer caso de onicomicosis por *T. cutaneum* fue reportado en Estados Unidos en 1984 en un hombre sano.^[13, 3] Gonder, en 1976 describió la leuconiquia micótica causada por *Trichosporon* y la consideró como una infección profesional relacionada con los trabajadores de impresiones de “offset”. Del líquido (glicerol) utilizado para la máquina de limpieza se aisló a la levadura.



Figura 6. Onicomicosis.



En la tabla 3, se resume el número de casos descritos en la literatura sobre onicomicosis. La casuística más grande fue descrita por Han MH, *et al*,^[17] con 236 casos y todos causados por *T. beigelii*. Esta especie junto con *T. cutaneum*

fueron las dos especies relacionadas con esta entidad clínica; más recientemente dos caso por *T. asahii*. [24]

Tabla 3. Onicomicosis causada por *Trichosporon* spp. Revisión de la literatura.

AUTOR	AÑO	PAÍS	NO. CASOS	ESPECIE DE TRICHOSPORON	REFERENCIA
Fusaro y Millar.	1984	E.U.A	1 (primer caso)	<i>T. beigelii</i>	13
Pritchard y Muir.	1985	Australia	63	<i>T. beigelii</i>	36
Pires MC, et al.	1995	Brasil	1	<i>T. beigelii</i>	35
Arce M, et al.	1998	México, D.F	6	<i>T. beigelii</i>	2
Han MH, et al.	2000	Corea	236	<i>T. beigelii</i>	17
Elmer KB, et al.	2002	E.U.A	1	<i>T. beigelii</i>	11
Pontes ZB, et al.	2002	Brasil	11	<i>Trichosporon</i> sp.	37
Ruiz – Esmenjaud, et al	2003	México, D.F	2	<i>Trichosporon</i> sp.	43
Archer –Dubon C, et al.	2003	México	1	<i>T. cutaneum</i>	3
Svejgaard EL, et al.	2004	Dinamarca	15	<i>T. cutaneum</i>	49
Mügge C, et al.	2006	Alemania	79	<i>Trichosporon</i> sp.	28
Gunduz T, et al.	2006	Turquía	6	<i>Trichosporon</i> sp.	16
Manzano – Gayosso, et al.	2008	México, D.F	2	<i>T. asahii</i>	24

DERMATOMICOSIS

En la tabla 4, se muestran los reportes de la literatura, donde *Trichosporon* ha causado infecciones de la piel de comportamiento polimorfo, relacionado en algunos casos con algún factor de inmunosupresión.

INTERTRIGO DE PIES

El intertrigo de pies causados por *Trichosporon*; éste se considera el cuarto agente más frecuente de este tipo de infección. La infección interdigital – plantar, por lo general está relacionado en pacientes con tiña de los pies. Se



manifiesta por placas eritematosas, maceración, descamación, vesículas – ampollas, hiperpigmentación y olor fétido. La descamación es el signo clínico más frecuente, seguida de la maceración. De acuerdo con algunos estudios realizados en México, en pacientes con dermatomicosis, en los cuales el cuarto espacio interdigital es el que se encontró afectado con mayor frecuencia. [3, 26]

Existen casos de infecciones superficiales en el área genital, ano y escroto en hombres homosexuales (13%) contra un 2.5% en hombres heterosexuales con infección rectal, presentando también un alto índice los pacientes inmunocomprometidos (3.7%). [10, 46]

Tabla 4. Dermatomicosis causadas por *Trichosporon*.

Autor	Año	País	No. casos	Dermatomicosis	Factor de riesgo	Especie de <i>Trichosporon</i>	Referencia
Greenberg RG, et al	1989	E.U.A	1	Infección localizada en piel	Post cirugía	<i>T. beigellii</i>	14
Piérad GE, et al	1992	Bélgica	3	Piel	Cáncer	<i>T. beigellii</i>	33
Nahass GT, et al	1993	E.U.A	2	Pápulas purpúricas y nódulos con necrosis central	VIH y neutropenia	<i>T. beigellii</i>	30
Lascaux AS, et al	1998	Francia	1	Pápulas purpúricas	VIH	<i>T. beigellii</i>	20
Nakagawa T, et al	2000	Japón	1	Eczema	Leucemia	<i>T. asahii</i>	29
Archer – Dubon C, et al	2003	México, D.F	8	Intertrigo de pies	Ninguno	<i>T. cutaneum</i>	3
Pulvirenti N, et al	2006	E.U.A	1	Placa eritematosa	Ninguno	<i>T. asahii</i>	38
Yun SJ, et al	2006	Corea	1	Abscesos cutáneos	Ninguno	<i>T. asahii</i>	56
Kim YJ, et al	2007	Corea	1	Púrpura fulminante	Ninguno	<i>T. asahii</i>	19
Morales – Trujillo, et al	2008	México, D.F	1	Intertrigo de pies	Ninguno	<i>Trichosporon sp.</i>	26



2.5.2 Infecciones Diseminadas o Sistémicas

El primer caso descrito de una infección sistémica causada por *Trichosporon* fue en 1970 en una paciente con absceso cerebral [34, 53]. La principal especie relacionada con esta infección fue *T. beigelii*; en estudios más recientes describieron otras especies genéticamente distintas y por lo tanto, actualmente *T. asahii* es la principal especie implicada en las infecciones diseminadas e invasivas. [42, 34]

Este tipo de infecciones, generalmente, se presentan en pacientes inmunocomprometidos por alguna enfermedad o síndrome como en el caso de pacientes con neutropenia, granulocitopenia, leucopenia, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, entre otras. En pacientes sometidos a transplante de órganos como de corazón, implantes de prótesis de válvulas y por la aplicación de catéteres intravenosos; este último factor debido a la contaminación secundaria. En la actualidad cada vez son más el número de reportes de infecciones sistémicas causadas por esta levadura afectando vías respiratorias, formación de abscesos cerebrales, endocarditis secundaria a las prótesis de válvulas, endoftalmitis postoperatoria, peritonitis, hepatitis, micosis gástrica, otomicosis y fungemia con diseminación cutánea. En la mayoría de las descripciones de los casos clínicos *T. asahii* es la principal especie implicada. [7, 8] Otros casos son los de infección de vías urinarias en pacientes inmunocomprometidos secundario a cateterización vesical. [42, 44, 45]

En las infecciones diseminadas, las manifestaciones clínicas están incluidas en un síndrome febril con un aumento en los azoados, infiltración pulmonar, disfunción renal y lesiones cutáneas polimorfas; la diseminación a otros órganos se lleva a cabo por vía sanguínea. Aparentemente la vía de entrada al organismo es el tracto digestivo o por vía aerógena, lo cual se correlaciona con la colonización intestinal y pulmonar en ausencia de síntomas. Sin embargo se han descrito casos asociados con inoculación intradérmica en adictos a drogas endovenosas. Estas levaduras pueden ser aisladas de muestras de esputo, líquido de aspirado bronquial orina, y sangre. [52, 34]

La descripción de casos de fungemias o de infecciones en tejidos profundos, han hecho que se le considere como un agente oportunista emergente.



2.5.3 Relación entre especies de *Trichosporon* y localización de la micosis

De las especies de *Trichosporon* descritas en la literatura, siete han sido relacionadas con micosis en el humano, cuatro de ellas con infecciones superficiales y tres infecciones diseminadas (tabla 5).

Tabla 5. Relación de especies con infecciones en el humano

INFECCIONES SUPERFICIALES	INFECCIONES DISEMINADAS O SISTÉMICAS
<i>T. cutaneum</i>	<i>T. asahii</i>
<i>T. asteroides</i>	<i>T. mucoides</i>
<i>T. inkin</i>	<i>T. pullulans</i>
<i>T. ovoides</i>	

2.6 Antifúngicos y Mecanismos de acción

Los antifúngicos empleados para el tratamiento de las infecciones fúngicas, se clasifican según su estructura química, su mecanismo de acción. Los antifúngicos pueden inhibir la síntesis de macromoléculas (fluocitosina), alterar la función de barrera de la membrana plasmática (polienos), inhibir la síntesis de ergosterol (azoles, alilaminas, tiocarbamatos, morfolinas), interacción con los microtúbulos (griseofulvina) y los que intervienen con la síntesis de la pared celular (β -1,3 D-glucano) (equinocandinas). También se pueden clasificar por su espectro de acción (amplio o restringido), de acuerdo a su origen (a partir de organismos vivos o sustancias sintéticas). ^[51, 54] Para los fines de este documento solo se mencionarán los mecanismos de acción de los antifúngicos estudiados.



2.6.1 Polienos

Anfotericina B

La anfotericina B es extraída de *Streptomyces nodosus*, es uno de los antifúngicos más eficaces y con espectro más amplio frente a la mayoría de los hongos patógenos, aunque puede comportarse como fungistático o fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada en el sitio de la infección. Su uso principal es en el tratamiento de las micosis profundas. Este antifúngico se une al ergosterol, siendo este el principal esteroide de la membrana fúngica y originando poros, lo que facilita la permeabilidad de los componentes intracelulares esenciales como iones, aminoácidos, con pérdida del contenido citoplasmático y muerte de la célula. La toxicidad selectiva de este antifúngico es debida a la mayor afinidad por el ergosterol frente al colesterol (principal esteroide de las células eucariotas de mamíferos). La resistencia a la anfotericina B se produce cuando el hongo es capaz de alterar el ergosterol de su membrana (Figura 7).^[54]

2.6.2 Azoles

Estos antifúngicos sintéticos, introducidos a fines de 1980, representaron un avance importante en el tratamiento de las infecciones fúngicas por su seguridad y perfil farmacocinético. La estructura de estos compuestos caracterizados por un anillo azólico de 5 átomos, unido por enlaces C-N a otros anillos aromáticos. En función del número de nitrógenos que posee el anillo se dividen en imidazoles (miconazol y ketoconazol) y triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol). De todos ellos, cinco se pueden utilizar en micosis sistémicas (ketoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol). El primero en utilizarse fue el ketoconazol, posteriormente sustituido por fluconazol que posee una serie de ventajas relacionadas con su espectro de acción, su farmacocinética y toxicidad. Por último, se incorporó a la terapéutica itraconazol y recientemente voriconazol. De forma general, estos derivados azólicos (particularmente fluconazol) son considerados fármacos de segunda elección en el tratamiento de las infecciones sistémicas producidas



por diversos hongos. El inconveniente de los azoles es su escasa utilidad en las infecciones invasivas graves por hongos filamentosos y en hongos con resistencia secundaria.

Estos interfieren con la síntesis de ergosterol, al inhibir la 14-alfa-desmetilasa, una enzima acoplada al citocromo P-450. Esta enzima se requiere para la síntesis de ergosterol. Esta inhibición altera la fluidez de la membrana, aumentando la permeabilidad y produciendo una inhibición del crecimiento celular y de la replicación. Esta inhibición del citocromo P-450 es responsable de los efectos adversos que los azoles pueden causar en humanos (Figura 7).
[51]

Voriconazol, es un triazol de segunda generación de amplio espectro, derivado sintético de fluconazol. El mecanismo de acción es como en otros azoles, es decir inhibe el citocromo P450 dependiente de la enzima 14-lanosterol-desmetilasa. Este antifúngico es el más potente inhibidor de la enzima fúngica, por lo tanto el resultado es su amplio espectro. Es una droga fungistática contra levaduras, principalmente *Candida* sp. incluso frente a especies que presentan resistencia innata como *C. glabrata* y *C. krusei*. Presenta buena actividad *in vitro* contra hongos filamentosos como *Penicillium*, *Fusarium*, *Scedosporium* y *Aspergillus*.

2.6.3 Alilaminas

Antifúngicos sintéticos donde terbinafina es el único fármaco comercializado en forma de tabletas.

La terbinafina interfiere con las primeras etapas de la síntesis de ergosterol, inhibiendo la enzima escualeno epoxidasa que realiza la epoxidación del escualeno para formar 2,3-oxidoescualeno, no se transforma en lanosterol y se acumula en esta forma, la célula. El resultado es la ruptura de la membrana y la muerte de la célula fúngica (Figura 7).^[54]

Presenta actividad frente a dermatofitos y un efecto sinérgico con azoles.



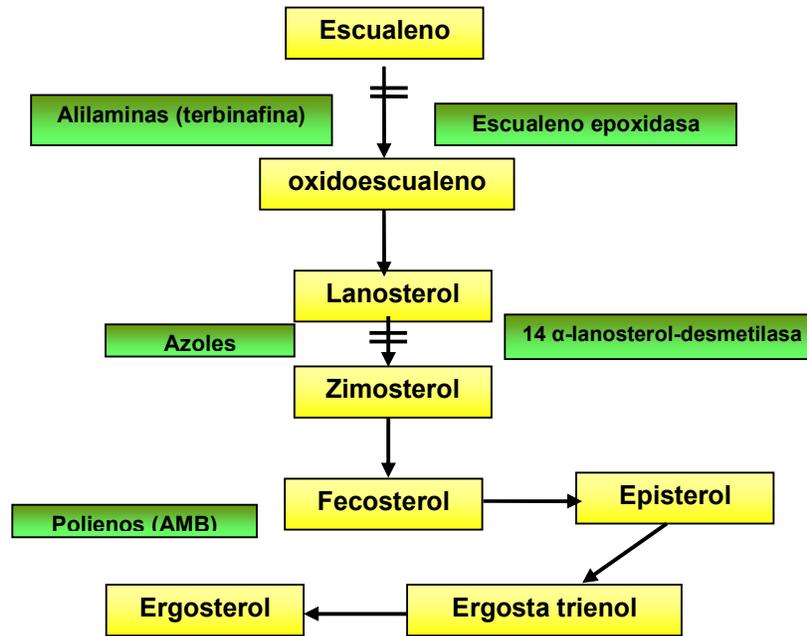


Figura 7. Mecanismo de acción de los antifúngicos que intervienen en la síntesis de ergosterol y las enzimas diana.

2.7 Mecanismos de resistencia antifúngica.

La resistencia clínica, ha sido definida como la persistencia o progresión de una infección a pesar de un tratamiento adecuado. La resistencia *in vitro* de un aislado, puede ser descrito como primaria o secundaria. La resistencia primaria, es la que presenta un organismo a una droga previa a una exposición, a esta también se le conoce como resistencia intrínseca o innata. La resistencia secundaria, es desarrollada en respuesta frente a la acción de un agente antifúngico. ^[54]

Son cuatro los mecanismos de resistencia antifúngica aceptados, estos ocurren en el interior de la célula:

1. Incapacidad del antifúngico para llegar a la diana dentro de la célula fúngica. Aumento en la expresión de bombas de eliminación activa del antifúngico al exterior.
2. Cambios en la interacción antifúngico – diana.
3. Modificación en la enzima de las vías metabólicas. Alteración estructural de la enzima 14 – α lanosterol – desmetilasa.



- Alteración en el procesamiento celular por degradación o modificación del antifúngico (Figura 8).

Desde el punto de vista molecular para los azoles, la enzima diana (14- α lanosterol – desmetilasa). El gen que codifica para esta proteína se le llama *ERG11*, en todas especies fúngicas.

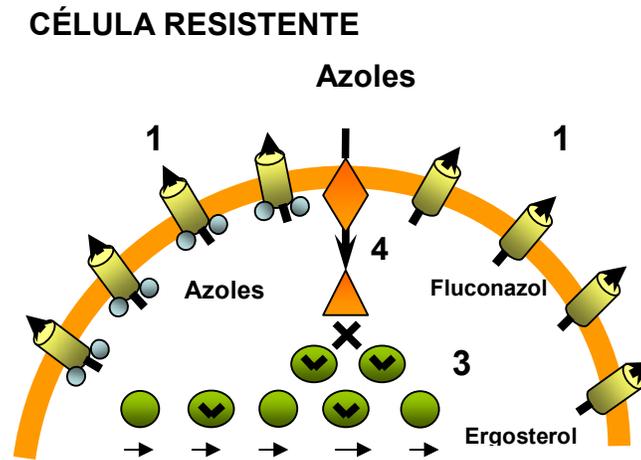


Figura. 8 Mecanismo de resistencia para los azoles

2.7.1 Antecedentes de resistencia a los antifúngica en las especies de *Trichosporon*

El tratamiento de elección empleado en las formas clínicas profundas e invasivas causadas por *Trichosporon* sp. es con anfotericina B, el resultado de este tratamiento ha sido pobre, debido a una alta mortalidad en pacientes tratados con esta droga antifúngica, por la alta resistencia. ^[52, 32] Otros estudios, han revelado que este agente también, es resistente a 5 – fluorcitosina, específicamente la especie *T. asahii*, en pacientes con esofagitis. ^[22] Fluconazol, itraconazol, voriconazol y ketoconazol, presentan una mayor actividad *in vitro* contra las diferentes especies de este agente. De acuerdo a estudios *in vitro* en aislados de *T. inkin* obtenidos de pacientes con transplantes cardiacos, voriconazol fue el antifúngico con mayor actividad. ^[39] En estudios realizados en pacientes con infección urinaria nosocomial *T. asahii* mostró alta



sensibilidad a fluconazol; y sensibilidad dosis dependiente a ketoconazol e itraconazol. [44]

2.8 Pruebas de Sensibilidad Antifúngica

2.8.1 Método de Microdilución en caldo

Para los estudios de sensibilidad se utilizan medios sintéticos definidos como RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) usando ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) como amortiguador y ajustar a un pH de 7. Es importante este pH para que el antifúngico no pierda su capacidad inhibitoria.

Existen múltiples métodos descritos que son aceptados para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):

Difusión en agar con discos o tabletas: E – test, Neosensitab

Dilución en caldo: Microdilución basado en el documento del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).

Otras técnicas comercializadas que incorporan una adaptación de la anterior son: Sensititre Yeast One, Fungitest, ATB Fungus 2.

La finalidad de cualquiera de los métodos es detectar la resistencia que presentan los hongos frente a los diferentes antifúngicos.

El método de microdilución en caldo, recomendado por el CLSI, de acuerdo con los diversos documento que han sido modificado hasta los más recientes el M27 – A2 en 2002 y M27 – A3 en 2008. En 1992, fue la primera publicación del documento M27, por el CLSI (antes NCCLS), el cual ha sido revisado, a partir de estudios Inter-laboratorios reproducibles de determinación de CMI, en pruebas para bacterias. El método de microdilución en caldo, fue adaptado para laboratorio clínico, con lo que fue demostrado que este método es reproducible y consistente con la estandarización del método, según los estudios preliminares. Investigaciones posteriores, sugirieron la determinación del punto de corte después de 24 horas de incubación, y no de 48 como se realizaba, asegurando que la CMI de los aislados se correlacionara con la respuesta *in vivo* a las drogas. Los avances en las técnicas de sensibilidad antifúngica, han sido frecuentemente revisados por diversos autores. [31, 32, 54, 55]



Sin embargo, esta técnica no es aplicable en los laboratorios clínicos que deben realizar estas pruebas diariamente, o que tienen presiones asistenciales y que dentro de su obligación es la información rápida para que tenga utilidad terapéutica.

Para la interpretación de los resultados de las pruebas de sensibilidad antifúngica, se determinaron los puntos de corte para los diferentes antifúngicos, como Sensible (S) y Resistente (R), y para los niveles intermedios de resistencia, como Sensible Dosis Dependiente (S-DD).^[32, 54]



III. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Aislados

Se estudiaron 23 aislamientos clínicos obtenidos de pacientes con diferentes dermatomicosis, como intertrigo de pies (13) y onicomicosis (10), los cuales se identificaron por su morfología macro y microscópica y mediante la prueba de asimilación de carbohidratos (API 20C Aux).

3.2 Estudio Morfológico

3.2.1 Cultivo monospórico

Los 22 aislamientos se sembraron en Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) e incubaron durante 48 horas a 30°C, De cada uno de los aislamientos se realizó una suspensión a una concentración de 10^6 conidios/mL y se tomaron 2µL que se sembraron por agotamiento sobre ADS, contenido en cajas Petri, e incubaron a 30°C por 48 horas. A partir de este crecimiento se obtuvo un cultivo monospórico de cada aislamiento.

El cultivo monospórico se obtuvo por el crecimiento de una colonia aislada, a partir del sembrado por agotamiento.

3.3 Morfología macroscópica

Para la observación de la morfología macroscópica, se siguió la técnica descrita por Lee, *et al*,^[21] partiendo de un inóculo de 2µL de una solución a concentración de 10^6 conidios/mL (Figura 9), se realizó una siembra masiva en ADS, y se incubaron a 28°C durante 48 horas. En las lecturas del crecimiento colonial se valoró: tamaño, aspecto y color, así como presencia de filamentos en el margen de la colonia (Figura 10).





Figura 9. Preparación de inóculo ajustando turbidez mediante densitómetro.



Figura 10. Crecimiento colonial: aspecto, tamaño y filamentos en el margen de la colonia

3.4 Morfología microscópica

Para la valoración de la morfología microscópica se realizó la técnica de microcultivo en ADS y en Agar Harina de Maíz (AHM).^[23]

3.4.1 Microcultivos

De las cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo ADS y AHM con Tween 80 al 1% de aproximadamente 5 a 7mm de espesor, se cortó un cuadro de 1cm por lado, con ayuda de un bisturí estéril, de cada uno de los medios. Estos se colocaron al centro del portaobjetos, ya preparado en la caja de Petri para microcultivo (Anexo II).

A cada uno de los lados del fragmento del medio de cultivo se inoculó una pequeña porción del aislamiento, posteriormente se colocó un cubreobjeto sobre el cuadro de agar ya inoculado. Se adicionan 10mL de agua glicerinada



al 10%, teniendo cuidado de no mojar el cultivo y se incubaron a oscuridad durante 48 horas a 28°C (Figura 11).

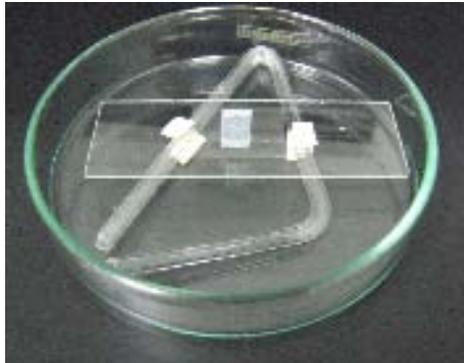


Figura 11. Técnica de microcultivo

Se retiró el cubreobjetos y se colocó sobre un portaobjetos limpio en el que previamente se colocó una gota de azul de algodón. También se retiró y desechó el fragmento de medio de cultivo del portaobjetos; se deposita al centro del portaobjetos una gota de azul de algodón y se colocó un cubreobjetos nuevo. En una hoja de reporte se registró la forma, tamaño, disposición de los conidios y formación de pseudohifas (Figura 12).

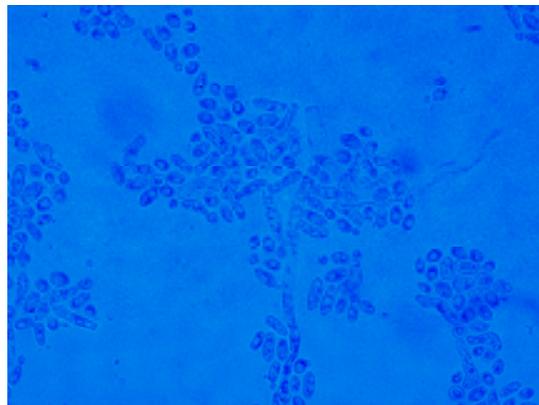


Figura 12. Morfología microscópica: artriconidios ovoides, algunos rectangulares y formación de pseudohifas.



3.4.2 Agar Harina de Maíz.

Para la observación de la morfología microscópica en AHM se realizó un inóculo, a partir del cultivo monospórico a una concentración 10^6 conidios/mL, en AHM por la técnica de Dalmau. Incubándose a 28°C por 72 horas.

3.4.2.1 Técnica de Dalmau.

Con una asa estéril tocar ligeramente la colonia de *Trichosporon* y dibujar 2 líneas sobre el AHM, de 3.5 cm de largo y a 1.2cm de separación. Esterilizar el asa y enfriar. Pasar el asa estéril, de un lado a otro sobre las dos líneas, diluyendo el inóculo. Cuidar de no perforar el agar. Con unas pinzas de disección, colocar un cubreobjeto de 22 mm sobre las líneas de inoculación. Incubar a 28°C durante 72 horas.

Colocar la caja Petri en el microscopio para su observación directa. Examinar cuidadosamente las áreas con el objetivo de 40X. Valorar la forma, tamaño y disposición de los conidios y otras estructuras (Figura 13).^[25]



Figura 13. Técnica de Dalmau



3.5 Pruebas Fisiológicas

3.5.1 Prueba de Urea

Para realizar esta prueba se utilizó el medio de Christensen, en el cual se inoculó la levadura en estudio por estría. Se incubaron a 28°C durante 72 horas.

La prueba se considera positiva cuando se produce una alcalinización del medio, la cual es dada por liberación de amonio y esto provoca un cambio del color original amarillo a rosa o rojo (Figura 14).^[23]



Figura 14. Prueba de urea positiva (color rosa o rojo): a) *Candida* spp;
b) *Trichosporon* spp; c) *Cryptococcus* spp

3.5.2 Asimilación de Carbohidratos (API 20C Aux)

3.5.2.1 Inóculo

Se preparó una suspensión de levaduras en 2 mL de solución de NaCl 0.85%, la turbidez se igualó al tubo 2 de Mac Farland, ajustado con el densitómetro. Esta solución debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación. De esta suspensión se transfieren 100 µL a una ampolleta de APIC *Medium* y se homogeneiza evitando la formación de burbujas.



3.5.2.2 Inoculación de galería

Se llenan los pozos con la suspensión obtenida en el APIC *Medium*, con aproximadamente 150µL. Evitar la formación de burbujas, colocando la punta de la pipeta sobre la zona lateral del pozo. Incubar a 30°C durante 48 horas (Figura 15).



Figura 15. Inóculo de galerías de API 20C Aux

3.5.2.3 Lecturas

Después de las 48 horas de incubación, se observa el crecimiento de las levaduras comparativamente con el pozo 0, testigo negativo. Un pozo con mayor turbidez que la del control, indica una reacción positiva. Los resultados obtenidos se registran en la hoja de datos (Figura 16).

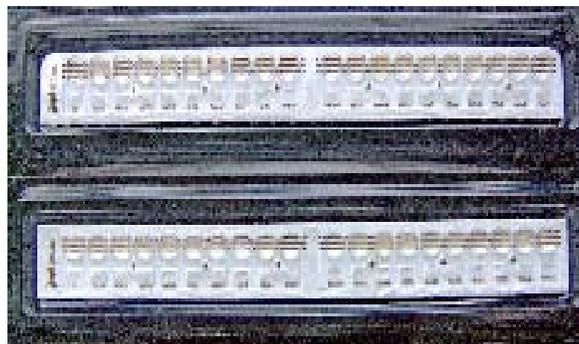


Figura 16. Lectura de la turbidez en las galerías API-20 Aux



Para dar un valor positivo al pozo número 21 de la galería, se realizó una determinación de presencia de hifas (micelio) o de pseudohifas en el AHM.

3.5.2.4 Interpretación

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico, mediante los valores obtenidos en la hoja de resultados, dando 7 cifras. Este valor se comparó con el apiweb. (Figura 17)

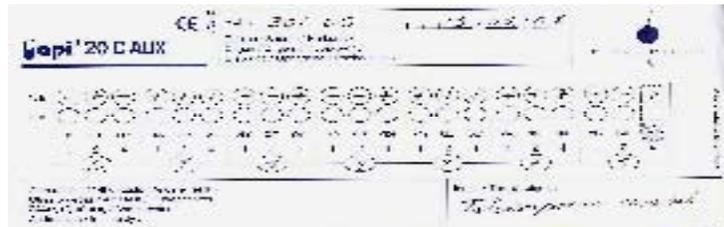


Figura 17. Interpretación de resultados API-20 Aux

3.6 Prueba de Sensibilidad Antifúngica *in vitro*

Método de microdilución en caldo

La prueba de sensibilidad antifúngica de los aislamientos fue realizada por el método de microdilución en caldo, de acuerdo al documento M27 A2 del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).^[31] Los antifúngicos usados fueron: ketoconazol (KTZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VRZ), fluconazol (FLZ), anfotericina B (AMB) y terbinafina (TRB).

3.6.1 Medio RPMI

Para este método se utilizó el medio líquido semisintético RPMI 1640 (GIBCO), con glutamina y sin bicarbonato de sodio, al cual se le adicionó como amortiguador ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) 0.164M, ajustando a pH 7 con NaOH 1M. Se esterilizó por filtración con unidades filtro de 0.2 μ m.



3.6.2 Antifúngicos

Hidrosolubles

Fluconazol

Insolubles

Anfotericina B

Itraconazol

Ketoconazol

Voriconazol

Terbinafina

3.6.3 Soluciones madre

Se preparó una solución madre de cada antifúngico a una concentración de 1600 μ g/mL. Los antifúngicos AMB, KTZ, ITZ, VRZ y TRB se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Fluconazol a una concentración de 6400 μ g/mL, fue disuelto en agua químicamente pura estéril. Estas soluciones se esterilizaron con unidades filtro de 0.2 μ m, y se conservaron en alícuotas a -20°C.

3.6.4 Preparación de microplacas con antifúngicos

A partir de las soluciones madre, se realizaron diluciones en medio RPMI, a concentraciones de 64 – 0.125 μ g/mL para FLZ y de 16 – 0.03 μ g/mL para los demás antifúngicos. De cada una de las diluciones se tomó 100 μ L y se depositaron en los pozos de las microplacas estériles de 96 pozos, quedando en forma decreciente las concentraciones; de tal manera que, en los pozos de la columna 1 se depositó la concentración mayor y en los pozos de la columna 10 la menor concentración de antifúngico. La columna 11 fue el control de crecimiento y solo contenía caldo RPMI para los solubles y RPMI más DMSO 1% para los antifúngicos insolubles; la columna 12 solo con RPMI como control de esterilidad.

3.6.5 Inoculación de microplacas

Para la elaboración del inóculo se realizó una suspensión de levaduras de *Trichosporon* spp. a partir de un cultivo monospórico de 48 horas de



crecimiento a 30°C a una concentración 10^6 células/mL; a partir de ésta, se hizo una dilución 1:1000 en medio RPMI para obtener una concentración de 10^3 células/mL. Se depositó 100 µL de la solución problema en cada pozo, de las filas “C” a la “H”. En las filas A y B se colocaron las cepas de control de calidad: “A” para *Candida parapsilopsis* ATCC22019 y en “B” *C. krusei* ATCC6258. (American Type Culture Collection), (Figura 18).

Inoculadas las microplacas se incubaron a 35°C durante 48 horas. Las lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas, mediante un espejo invertido, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es el 80% de inhibición de crecimiento.

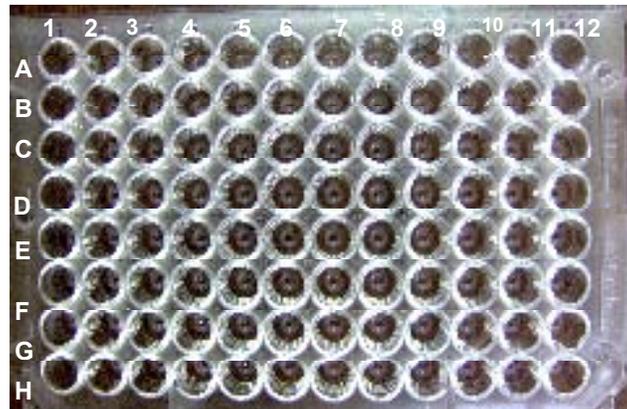


Figura 18. Microplaca de 96 pozos. En los pozos de la columna 1 la mayor concentración del antifúngico. En los de la columna 10 la menor concentración. En la fila A y B la cepas control de calidad; filas C a H aislados problema.

3.6.6 Interpretación de resultados

Las lecturas obtenidas se compararon con los Criterios de sensibilidad del documento M27 – A2 del CLSI, para obtener los parámetros de Sensibilidad (S), Sensibilidad Dosis Dependiente (S-DD) y Resistencia (R) para cada antifúngico frente a los aislamientos en estudio (tabla 6). En la tabla 7 se describen los rangos de CMI de las cepas control de calidad frente a diferentes antifúngicos.



Tabla 6. Puntos de corte para la interpretación de S, S-DD y R del CLSI para algunos antifúngicos.

Antifúngico	SENSIBLE	S-DD	RESISTENTE
KTZ (µg/mL)	≤ 0.125	0.25 – 0.5	≥ 1
ITZ (µg/mL)	≤ 0.125	0.25 – 0.5	≥ 1
VRZ (µg/mL)	≤ 1	2	≥ 4
FLZ (µg/mL)	≤ 8	16 – 32	≥ 64
AMB (µg/mL)	≤ 1	–	≥ 2

Tabla 7. Intervalos de CMI en las cepas control de calidad frente a diferentes antifúngicos

ANTIFÚNGICO	<i>C. parapsilopsis</i> ATCC22019		<i>C. krusei</i> ATCC6258	
	24 h	48h	24 h	48 h
KTZ (µg/mL)	0.03-0.125	0.03-0.125	0.125-1.0	0.25-1.0
ITZ (µg/mL)	0.125-0.5	0.125-0.5	0.125-1.0	0.25-1.0
VRZ (µg/mL)	0.013-0.125	0.03-0.25	0.06-0.5	0.25-1.0
FLZ (µg/mL)	0.5-4.0	1.0-4.0	8.0-64.0	16.0-128.0
AMB (µg/mL)	0.25-2.0	0.5-4.0	0.5-2.0	1.0-4.0



IV. RESULTADOS

De las 23 especies de *Trichosporon* aislados, 5 se obtuvieron de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. De todos los aislados 12 se obtuvieron de individuos del género femenino, y 11 masculino, cuyo intervalo de edad fue de 12 a 69 años. 13 de los aislamientos causaron intertrigo de pies y 10 onicomicosis. En todos los especímenes procesados por examen directo con KOH al 15% se observaron filamentos hialinos, y en algunos la presencia de levaduras.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas morfológicas, se observaron diversas características del género *Trichosporon*, siendo estas diferentes, aún tratándose de la misma especie.

Las características predominantes fueron las siguientes: 12 colonias glabras, en su mayoría de color amarillenta y blanco – amarillenta, 9 y 8 respectivamente; 10 con elevación central anular, seguida de las rugosas y lobuladas; algunas presentaron pliegues en el margen, y otras vellosas y/o lisas. El diámetro de la colonia varió entre 10 y 19mm, con un promedio de 13.8mm.

Algunas características fueron muy diversas entre especie, como lo fue para *T. asahii*, que presentó variaciones como en el color de la colonia que fueron amarillas 7 de los 15 aislamientos identificados como esta especie, 5 fueron blanco – amarillentas y las restantes presentaron un color blanco; en cuanto al aspecto predominó la presencia de una elevación peri-central anular en 7 de los aislamientos, y la formación de gránulos y lóbulos en los otros; en algunas se observaron pliegues y protuberancias en el margen; 10 de estos eran glabros, los demás mostraron vellosidad en el margen de la colonia. El tamaño de la colonia varió entre 10 y 17mm. (Figuras 19 y 20). Con los datos morfológicos antes expuestos se establecieron tres morfotipos: 1) Anular – plegado – veloso; 2) Rugoso – glabro; 3) Multilobular – glabro.

En las colonias de *T. mucoides* predominó el color blanco, ya que solo una de las 4 aislados fue amarillento; también 3 presentaron el margen veloso y una de aspecto aterciopelado; se observó elevación peri-central anular, pliegues, con gránulos y lisa. (Figura 21). Al igual que para la especie anterior,



en ésta se establecieron tres morfotipos: 1) Plegado – veloso – húmedo; 2) Plano – anular; 3) Granular – veloso.

Las características morfológicas de los aislamientos identificados como *T. cutaneum* y *T. inkin*, fueron ambas de aspecto rugoso, y de color amarillenta, en el margen de la colonia de *T. cutaneum* se observó la formación de pliegues, a diferencia de *T. inkin* que fue liso y granuloso (Figura 22).

En la morfología microscópica se observaron conidios de 2 hasta 8µm de diámetro, de forma redonda a ovalada, y formación de pseudomicelio. La presencia de artroconidios de forma rectangular y ovoide, cuyo tamaño varió de 3 a 6µm de ancho y de 4 hasta 12µm de largo (tabla 8) (Figuras 23 y 24).

Con las pruebas morfológicas y la de hidrólisis de urea (Figura 25) se identificó el género de los 23 aislamientos y solamente en 21 por asimilación de carbohidratos (API 20C Aux) se llegó a especie (tabla 9). La especie que predominó fue *T. asahii*, en 15 casos, con el siguiente perfil de asimilación de carbohidratos: rafinosa, sorbitol, melobiosa, Myo – inositol, negativos y con una asimilación parcial de sacarosa. Para *T. cutaneum*, el patrón de asimilación de carbohidratos fue positivo para casi todos los azúcares, excepto para rafinosa que presentó una asimilación variable. Los 4 aislados identificados como *T. mucoides* presentaron la prueba de asimilación positiva para todos los carbohidratos. La diferencia en el patrón de asimilación observada entre *T. asahii* y *T. inkin* fue en la asimilación de Myo – inositol y L – arabinosa, respectivamente. Todos los aislados resistieron la exposición a cicloheximida 0.1% (tabla 9).

Para la interpretación de los resultados de sensibilidad antifúngica en cada uno de los aislados frente a los diversos antifúngicos se consideró al 80% de inhibición de crecimiento como CMI. En la tabla 10 se muestra el resultado de CMI de los 23 aislados de *Trichosporon*, en donde se observa que dos de los 15 aislados de *T. asahii* fueron resistentes a KTZ, cinco a ITZ, cinco a AMB y 8 a TRB; todos los aislados fueron sensibles frente a VRZ y a FLZ. En la Figura 26 se muestran diferentes placas con CMI en parámetros de resistencia y sensibilidad para diferentes antifúngicos.

En los aislados de *T. mucoides* los resultados fueron diversos, ya que uno de ellos (FM 50 – 05) presentó resistencia a KTZ, ITZ y TRB y S – DD a FLZ; y otro (FM 279 – 05(1)) solo mostró resistencia a TRB; los dos aislamientos



restantes fueron sensibles frente a todos los antifúngicos. En el caso de *T. cutaneum*, sólo mostró resistencia frente a ITZ y a TRB. *T. inkin* presentó sensibilidad frente a todos los antifúngicos.

Debido a la variabilidad de resultados aún tratándose de la misma especie, fue necesario considerar los intervalos de CMI para cada especie frente a los diferentes antifúngico, así como la media geométrica, estos datos se muestran en las tablas 11 y 12.

Al evaluar la media geométrica de la CMI, independiente de la especie, VRZ y FLZ son los antifúngicos que mostraron mayor actividad; mientras que ITZ, KTZ, AMB y TRB menor actividad.

En la Gráfica 1 se muestran los porcentajes obtenidos de CMI para cada uno de los antifúngicos dividiéndose en parámetros de sensibilidad (S), sensible – dosis dependiente (S-DD) y resistente (R), donde se observa que para los antifúngicos ITZ y TRB la resistencia fue de 34.8% en ambos; mientras que para AMB del 17.4% y para KTZ del 8.7%. El 100% de los aislamientos mostraron sensibilidad frente a VRZ, así como el 95.7% fue sensible a FLZ. El 43.5% y 39% de los aislamientos fue S-DD para ITZ, y para KTZ, respectivamente.



TABLAS Y GRÁFICA



Tabla 8. Morfología macroscópica y microscópica de *Trichosporon* spp.

CLAVE	ESPECIE	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	TAMAÑO COLONIA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (AHM Y MICROCULTIVO)
FM 31	<i>T. asahii</i>	Colonia blanca – amarillenta Elevación central anular Pliegues en el margen Ligeramente vellosa	12mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 3 – 5 µm A: 3 – 5 µm ancho 4 - 8 µm largo
FM 85-05	<i>T. asahii</i>	Colonia blanca - amarillenta. Ligera elevación central, aterciopelada Glabra y plegada en el margen	17 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 4 – 6 µm A: 4 – 6 µm ancho 4 – 10 µm largo
FM 109-05	<i>T. asahii</i>	Colonia blanca Protuberancias centrales discontinuas dispuestas en anillo. Vellosa en el margen	13 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 4 – 8 µm A: 3 – 5 µm ancho 4 – 8 µm largo
FM 111-05	<i>T. asahii</i>	Colonia amarillenta. Elevación central anular Pliegues en el margen. Glabra.	15 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 4 – 6 µm A: 4 – 5 µm ancho 4 – 8 µm largo
FM 115-05	<i>T. asahii</i>	Colonia amarillenta. Levantamiento central anular Rugosa	12 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 4 – 8 µm A: 4 – 6 µm ancho 4 – 10 µm largo
FM 149-05	<i>T. asahii</i>	Colonia blanca Elevación central anular Pliegues en el margen del anillo Ligeramente vellosa	12 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 4 – 6 µm A: 3 – 5 µm ancho 4 – 10 µm largo
FM 217-05	<i>T. asahii</i>	Colonia amarillenta Rugosa Glabra	11 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 4 – 6 µm A: 4 – 6 µm ancho 4 – 10 µm largo
FM 268-05	<i>T. asahii</i>	Colonia blanca Depresión central Pequeños pliegues concéntricos Glabra	13 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 4 – 6 µm A: 4 – 6 µm ancho 4 – 12 µm largo

C: conidios A: arthroconidios



Continuación....

CLAVE	ESPECIE	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	TAMAÑO COLONIA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (AHM Y MICROCULTIVO)
FM 274-05 (1)	<i>T. asahii</i>	Colonia amarillenta Rugosa al centro Margen formando anillos pequeños y con pliegues Glabra.	16 mm	Blastoconidios Artroconidios Pseudomicelio C: 2 – 4 µm A: 3 – 4 µm ancho 4 – 8 µm largo
FM 274-05(2)	<i>T. asahii</i>	Colonia blanca – amarillenta Elevación central anular Plegada en el margen del anillo Ligeramente vellosa	14 mm	Blastoconidios Artroconidios Pseudomicelio C: 3 – 4 µm A: 3 – 4 µm ancho 4 – 10 µm largo
FM 280-05 (2)	<i>T. asahii</i>	Colonia amarillenta Multilobulada Glabra	14 mm	Blastoconidios Artroconidios Pseudomicelio C: 3 – 6 µm A: 3 – 5 µm ancho 4 – 12 µm largo
FM 301-05	<i>T. asahii</i>	Colonia blanca – amarillenta Depresión central. Multilobulada (3 lóbulos) Glabra	10 mm	Blastoconidios Artroconidios Pseudomicelio C: 4 – 8 µm A: 3 – 5 µm ancho 4 – 8 µm largo
FM 306-05	<i>T. asahii</i>	Colonia blanca – amarillenta Elevación central lisa. Protuberancias en el margen Glabra	16 mm	Blastoconidios Artroconidios Pseudomicelio C: 3 – 4 µm A: 4 – 6 µm ancho 4 – 8 µm largo
FM 11-05	<i>T. asahii</i>	Colonia amarillenta Rugosa al centro Borde pericentral elevado y plegado Vellosidad en el margen	13 mm	Blastoconidios Artroconidios Pseudomicelio C: 3 – 8 µm A: 4 – 6 µm ancho 4 – 8 µm largo
IGM 89-04	<i>T. asahii</i>	Colonia amarillenta Gránulos al centro y margen Elevación central anular Glabra.	14 mm	Blastoconidios Artroconidios Pseudomicelio C: 4 – 6 µm A: 3 – 6 µm ancho 4 – 8 µm largo

C: conidios A: artroconidios



Continuación....

CLAVE	ESPECIE	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	TAMAÑO COLONIA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (AHM Y MICROCULTIVO)
FM 59-05	<i>T. cutaneum</i>	Colonia amarillenta Plegada Glabra.	11 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 3 – 6 µm A: 2 – 6 µm ancho 3 – 8 µm largo
FM 280-05(1)	<i>T. inkin</i>	Colonia amarillenta Centro plegado a cerebriforme Margen liso pulverulento	14 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 3 – 4 µm A: 4 – 5 µm ancho 4 – 8 µm largo
FM 48-05	<i>T. mucoides</i>	Colonia blanca – amarillenta Centro liso, plano elevación anular concéntrica y margen ligeramente veloso.	12 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 4 – 6 µm A: 4 – 6 µm ancho 4 – 10 µm largo
FM 50-05	<i>T. mucoides</i>	Colonia blanca. Pliegues elevados. Velloso Aspecto húmedo	15 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 3 – 4 µm A: 3 – 5 µm ancho 4 – 10 µm largo
FM 279-05(1)	<i>T. mucoides</i>	Colonia blanca Lisa al centro. Ligeramente convexa elevación anular periférica. Aterciopelada y ligeramente plegada.	15 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 3 – 6 µm A: 2 – 6 µm ancho 2 – 8 µm largo
FM 842	<i>T. mucoides</i>	Colonia blanca. Elevación central con gránulos Velloso en el margen	15 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 4 – 8 µm A: 4 – 6 µm ancho 4 – 10 µm largo
FM 51	<i>Trichosporon</i> sp	Colonia amarillenta Multilobulada (4 lóbulos) Plegada Glabra.	15 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio A: 4 – 6 µm ancho 10 – 20 µm largo
FM 262-A	<i>Trichosporon</i> sp	Colonia blanca – amarillenta Rugosa. Glabra	19 mm	Blastoconidios Arthroconidios Pseudomicelio C: 3 – 4 µm A: 3 – 4 µm ancho 4 – 10 µm largo

C: conidios A: arthroconidios



Tabla 9. Pruebas para la identificación de las especies de *Trichosporon*.

CLAVE	ADS	ADS + CICLOHEXAMINA Y CLORANFENICOL	UREA	API 20C – AUX
FM 31	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 85-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 109-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 111-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 115-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 149-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 217-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 268-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 274-05(1)	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 274-05(2)	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 280-05 (2)	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 301-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 306-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 11-05	+	+	+	<i>T. asahii</i>
IGM 89-04	+	+	+	<i>T. asahii</i>
FM 59-05	+	+	+	<i>T. cutaneum</i>
FM 280-05(1)	+	+	+	<i>T. inkin</i>
FM 48-05	+	+	+	<i>T. mucoides</i>
FM 50-05	+	+	+	<i>T. mucoides</i>
FM 279-05 (1)	+	+	+	<i>T. mucoides</i>
FM 842	+	+	+	<i>T. mucoides</i>
FM 51	+	+	+	<i>Trichosporon</i> sp
FM 262-A	+	+	+	<i>Trichosporon</i> sp



Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria observada para cada antifúngico frente a los 23 aislados de *Trichosporon* spp.

CLAVE	ESPECIE	CMI ₈₀ (µg/mL)					
		KTZ	ITZ	VRZ	FLZ	AMB	TRB
FM 31	<i>T. asahii</i>	0.5	2.0	0.125	1.0	0.25	2.0
FM 85-05	<i>T. asahii</i>	0.125	1.0	0.125	0.5	2.0	0.5
FM 109-05	<i>T. asahii</i>	0.25	0.5	0.125	1.0	0.5	4.0
FM 111-05	<i>T. asahii</i>	0.25	1.0	0.06	0.25	0.5	2.0
FM 115-05	<i>T. asahii</i>	2.0	4.0	0.25	2.0	4.0	4.0
FM 149-05	<i>T. asahii</i>	0.03	0.125	0.125	8.0	0.125	0.5
FM 217-05	<i>T. asahii</i>	0.25	0.25	0.125	0.5	0.25	0.5
FM 268-05	<i>T. asahii</i>	0.06	0.25	0.03	0.25	0.5	0.5
FM 274-05 (1)	<i>T. asahii</i>	0.125	0.125	0.03	1.0	0.5	0.5
FM 274-05(2)	<i>T. asahii</i>	0.06	0.25	0.03	1.0	0.06	0.25
FM 280-05 (2)	<i>T. asahii</i>	0.25	0.25	0.06	2.0	0.125	0.125
FM 301-05	<i>T. asahii</i>	0.5	2.0	0.125	2.0	2.0	2.0
FM 306-05	<i>T. asahii</i>	0.25	0.5	0.125	1.0	2.0	1.0
FM 11-05	<i>T. asahii</i>	0.25	0.25	0.125	2.0	1.0	2.0
IGM 89-04	<i>T. asahii</i>	0.125	0.125	0.06	2.0	0.25	1.0
FM 59-05	<i>T. cutaneum</i>	0.5	1.0	0.125	1.0	0.125	1.0
FM 280-05(1)	<i>T. inkin</i>	0.125	0.25	0.03	4.0	0.125	0.5
FM 48-05	<i>T. mucoides</i>	0.03	0.03	0.03	0.25	0.06	0.03
FM 50-05	<i>T. mucoides</i>	1.0	2.0	0.5	32.0	0.125	4.0
FM 279-05 (1)	<i>T. mucoides</i>	0.125	0.5	0.125	1.0	0.25	2.0
FM 842	<i>T. mucoides</i>	0.125	0.5	1.0	4.0	0.25	0.5
FM 51	<i>Trichosporon</i> sp.	0.03	0.06	0.03	0.25	0.25	0.5
FM 262-A	<i>Trichosporon</i> sp.	0.06	1.0	0.125	1.0	1.0	1.0

Tabla 11. Intervalos y media geométrica para cada especie frente a ketoconazol, itraconazol y voriconazol.

ESPECIE	N	KTZ (µg/mL)		ITZ (µg/mL)		VRZ (µg/mL)	
		I	MG	I	MG	I	MG
<i>T. asahii</i>	15	0.03-0.25	0.335	0.125-4.0	0.842	0.03-0.25	0.101
<i>T. mucoides</i>	4	0.03-1.0	0.262	0.03-2.0	0.618	0.03-1.0	0.337
<i>T. inkin</i>	1	0.125	0.125	0.25	0.25	0.03	0.03
<i>T. cutaneum</i>	1	0.5	0.5	1.0	1.0	0.125	0.125
<i>Trichosporon</i> sp.	2	0.06	0.06	1.0	1.0	0.125	0.125

I: Intervalos MG: media geométrica



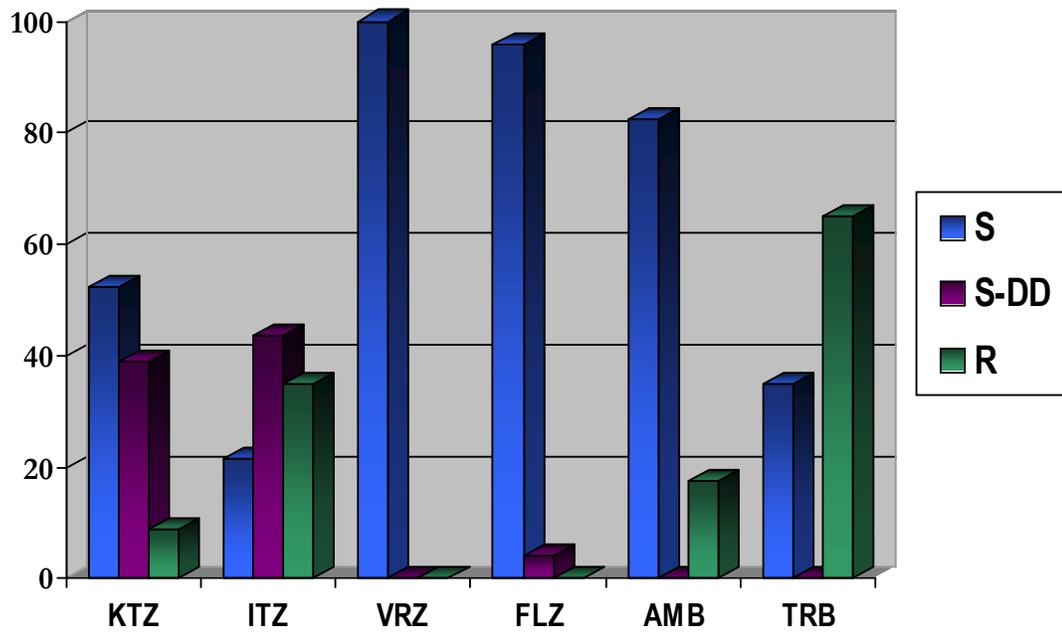
Tabla 12. Intervalos y media geométrica de cada especie frente a fluconazol, anfotericina B y terbinafina.

ESPECIE	N	FLZ (µg/mL)		AMB (µg/mL)		TRB (µg/mL)	
		I	MG	I	MG	I	MG
<i>T. asahii</i>	15	0.25-8.0	1.63	0.03-4.0	0.935	0.125-4.0	1.391
<i>T. mucoides</i>	4	0.25-32	7.5	0.06-0.25	0.187	0.03-4.0	1.406
<i>T. inkin</i>	1	4.0	4.0	0.125	0.125	0.5	0.5
<i>T. cutaneum</i>	1	1.0	1.0	0.125	0.125	1.0	1.0
<i>Trichosporon</i> sp.	1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

I: Rango MG: media geométrica



GRÁFICA 1. Porcentaje de Sensibilidad, S – DD y Resistencia para cada antifúngico.



IMÁGENES





a) *T. asahii* (FM-31). Colonia blanca – amarillenta, ligeramente vellosa levantamiento anular peri-central y pliegues en el margen del anillo.



b) *T. asahii* (FM-85-05) Colonia blanca-amarillenta, glabra en el margen y plegada, centro elevado aterciopelado.



c) *T. asahii* (FM-109-05) Colonia blanca, protuberancias peri-centrales discontinuas, dispuestas en anillo, margen vellosa.



d) *T. asahii* (FM-111-05) Colonia amarillenta, glabra, elevación anular peri-central, con pliegues en el margen.

Figura 19. Diversidad morfológica macroscópica de *T. asahii*.





e) *T. asahii* (FM115-05) Colonia amarillenta levantamiento peri-central anular, rugoso.



f) *T. asahii* (FM-274-05(1)) Colonia amarillenta, glabra, rugosa al centro, margen con pliegues y formación de anillos concéntricos.



g) *T. asahii* (FM-280-05(2)) Colonia amarillenta, glabra, multilobulada.

Figura 20. Diversidad morfológica macroscópica de *T. asahii*.





a) *T. mucoides* (FM-279-05(1)) Colonia blanca aterciopelada, centro liso ligeramente convexo, elevación anular periférica y ligeramente plegada.



b) *T. mucoides* (FM-48-05) Colonia blanca – amarillenta, centro liso, plano, elevación anular concéntrica y margen ligeramente veloso.



c) *T. mucoides* (FM-50-05) Colonia blanca, elevación peri-central anular, ligeramente veloso en el margen. aspecto húmedo.

Figura 21. Diversidad morfológica macroscópica de *T. mucoides*.





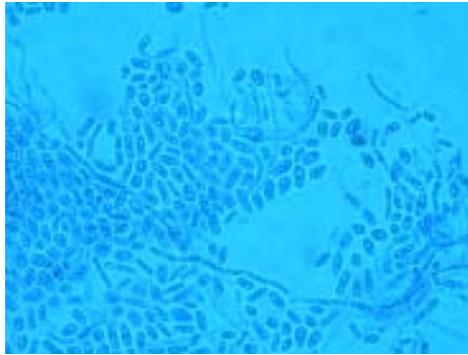
a) *T. cutaneum* (FM-59-05) Colonia amarillenta, glabra, plegada



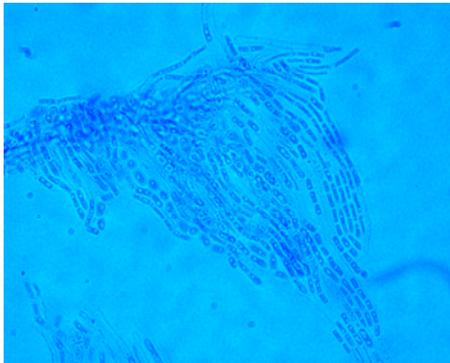
b) *T. inkin* (FM 280-05(1)) Colonia amarillenta. Centro plegado a cerebriforme, margen liso pulverulento

Figura 22. Diversidad morfológica macroscópica a) *T. cutaneum* y b) *T. inkin*.

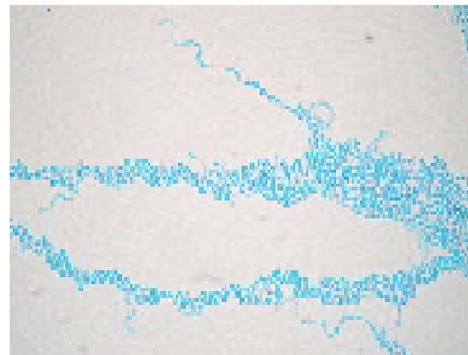




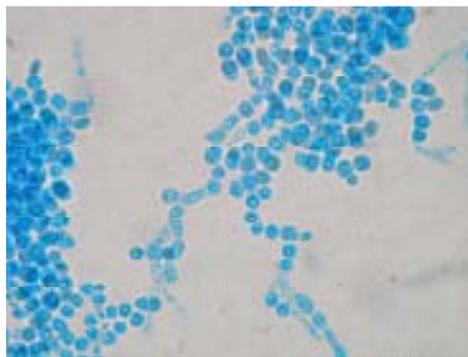
a) *T. asahii* (FM 301 - 05)



b) *T. asahii* (FM 109 - 05)



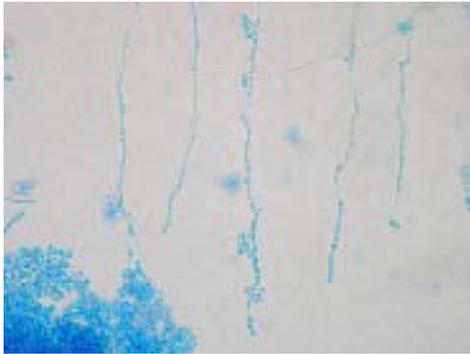
c) *T. asahii* (FM 115 - 05)



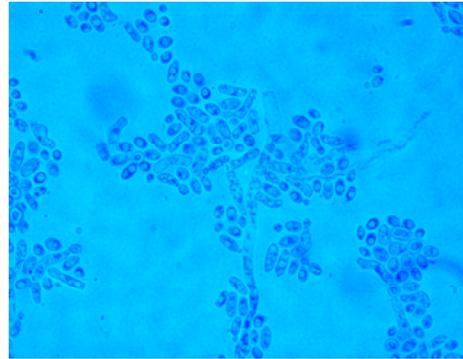
d) *T. asahii* (FM 274 - 05 (1))



Figura 23. Diversidad morfología microscópica la especie *T. asahii*. Conidios ovoides, artroconidios redondos y ovalados, pseudomicelio



a) *T. cutaneum* (FM 59 – 05)



b) *T. mucoides* (FM 48-05)

Figura 24. Morfología microscópica a) *T. cutaneum* (FM 59-05) y b) *T. mucoides* (FM 48-05) Conidios ovoides, arthroconidios redondos y ovalados, pseudomicelio



Figura 25. Hidrólisis de urea: a) *Candida* spp; b) *Trichosporon* spp; c) *Cryptococcus* spp



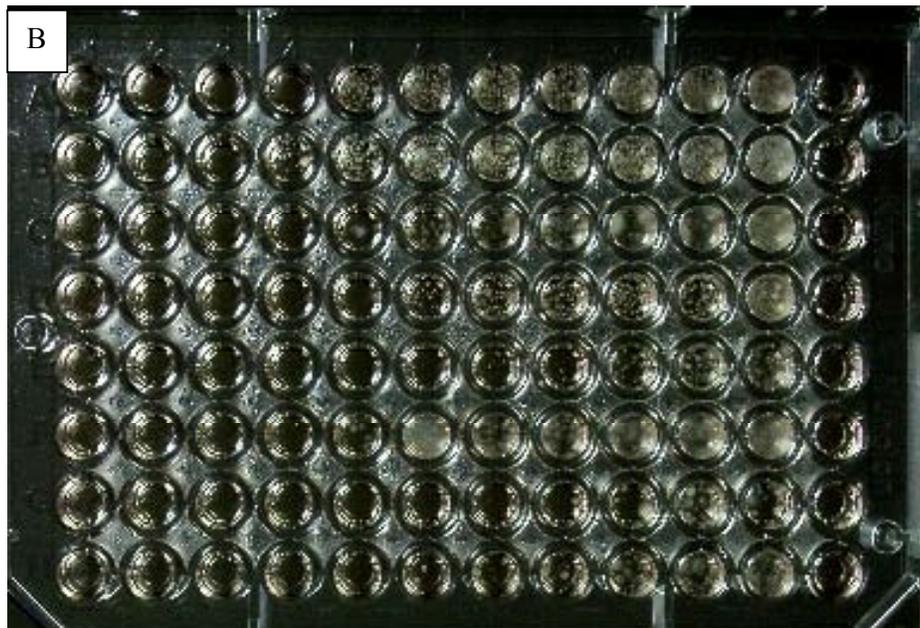
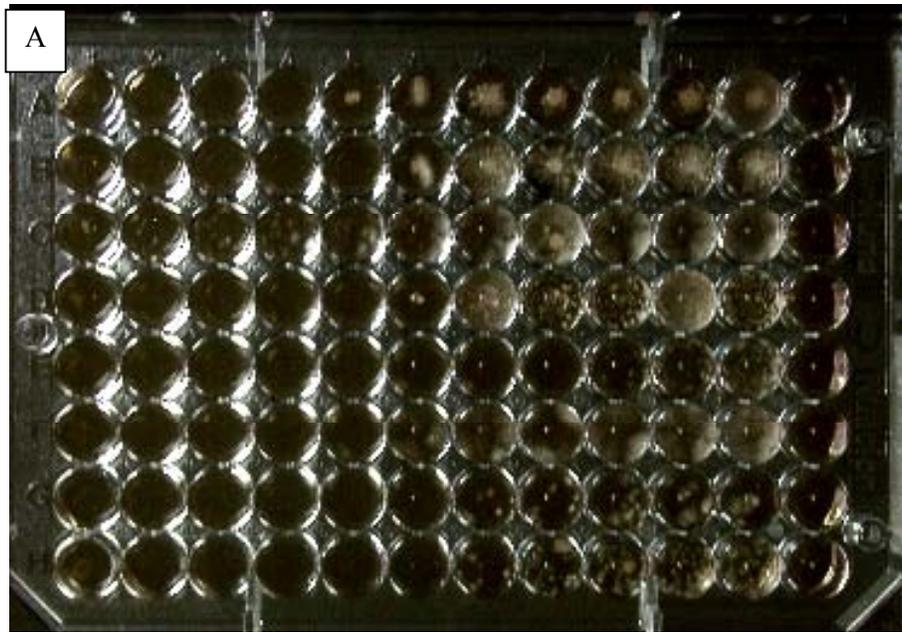


Figura 26. Placa (A) de microdilución, AMB y *Trichosporon* spp., en la fila "c" CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$. En la Placa (B) ITZ y *Trichosporon* spp., en la fila "f" CMI 1 $\mu\text{g/ml}$.



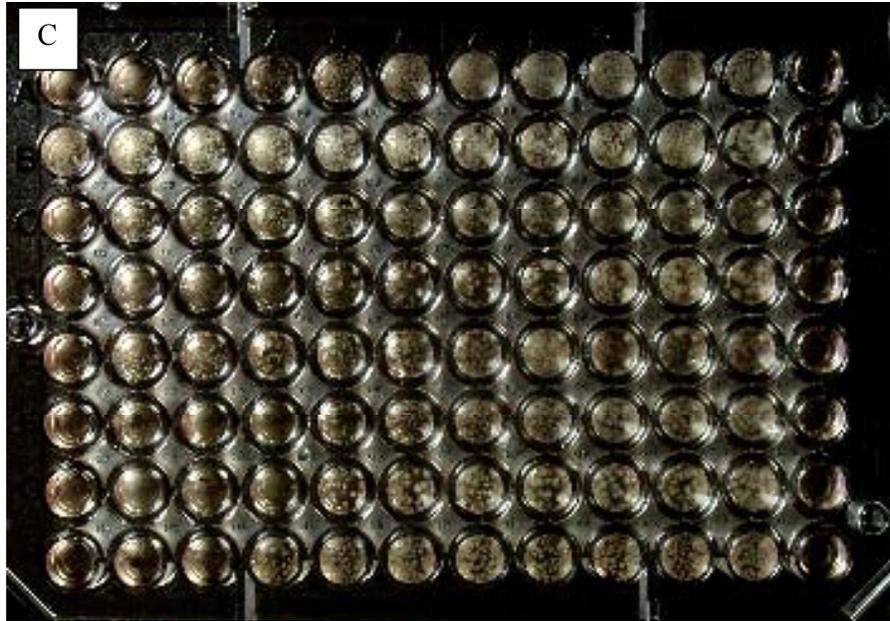


Figura 27. En la placa (C) TRB y *Trichosporon* spp., en la fila “c”, “e” y “h” CMI 4 $\mu\text{g/ml}$. Placa (D) VRZ y *Trichosporon* spp, la CMI 0.03 $\mu\text{g/ml}$.



V. DISCUSIÓN

Las infecciones superficiales y diseminadas o profundas causadas por las especies de *Trichosporon*, han sido descritas por diversos autores. [1, 7, 3] Debido a la alta mortalidad observada en los pacientes con tricosporonosis diseminada ha llevado a los investigadores a realizar estudios relacionados con el agente y el reporte de nuevos casos clínicos, ya que han sido pocos los trabajos realizados, a pesar de considerarlo un patógeno emergente, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. [8, 44, 45] La principal especie causante de tricosporonosis diseminada o fungemias por *Trichosporon* ha sido *T. asahii*. En cambio en las infecciones superficiales son varias las especies relacionadas, siendo *T. cutaneum* (*T. beigelii*) la especie implicada en el mayor número de casos. [3, 17, 36, 49]

En el presente estudio los 23 aislamientos de *Trichosporon* se obtuvieron de pacientes con dermatomycosis, como intertrigo de pies (13 casos) y onicomicosis (10 casos), a los que después de realizar las pruebas de morfología y fisiológicas, la mayoría se identificaron como *T. asahii* (15 casos). En la literatura internacional los casos descritos de micosis superficiales causadas por *Trichosporon* en pacientes inmunocompetentes se relacionó con *T. cutaneum* (*T. beigelii*), [17, 36, 49] mientras que por *T. asahii* estuvieron relacionados con alguna enfermedad inmunosupresora como diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y leucemia. En nuestro estudio de los 15 aislados de *T. asahii*, solamente tres se obtuvieron de pacientes con DMT2.

En todos los aislamientos se observó diferencia en la morfología macroscópica y microscópica, e incluso entre los aislados de la misma especie, como ya ha sido descrito por otros autores. [21, 41] Lee *et al*, [21] en su estudio de 18 aislados de *T. beigelii* describió dos morfotipos principales que fueron el tipo rugoso y el granuloso. En el primero destacó el predominio de hifas y en el segundo de blastoconidios, artroconidios y pocas hifas. Además, de que los aislados de formas diseminadas presentaron hifas en mayor porcentaje que las tricosporonosis superficiales, este fenómeno aparentemente relacionado con la temperatura. En el presente estudio se identificaron tres morfotipos de *T. asahii*: el tipo anular – plegado – veloso, donde predominaron los artroconidios rectangulares; en el rugoso – glabro con una mezcla de artroconidios ovales en



disposición catenulada y el tipo multilobular – glabro una mezcla de artroconidios ovales y rectangulares en agrupaciones. También fue evidente que entre los aislados de *T. mucoides* se identificaron tres morfotipos: plegado – veloso – húmedo; plano – anular y el granular – veloso. Microscópicamente no se observó ninguna diferencia entre los conidios de los diferentes morfotipos, pero sí hubo un predominio de éstos sobre la presencia de hifas, como lo hace notar en otros reportes, en donde aparentemente la temperatura de 37°C influyó en la presencia de hifas, en los aislados obtenidos de pacientes con tricosporonosis diseminada. [21] En nuestro estudio no se pudo corroborar este factor debido a que solo se incluyeron aislados obtenidos de pacientes con dermatomicosis y la temperatura empleada fue de 28°C.

Independientemente de la especie de *Trichosporon*, dos de las características morfológicas que destacaron en los aislados del presente estudio fue el aspecto glabro (56.5%) y velosidades en la periferia (34.8%).

Mediante la morfología microscópica, evaluando la forma de artroconidios, blastoconidios y pseudomicelio, fue posible diferenciar a *Trichosporon* de otros géneros de levaduras, como *Candida* y *Geotrichum*. Observaciones que coinciden con la descripción de otros autores con respecto al género *Trichosporon*. [20, 22, 40]

Es limitada la información que se tiene acerca del patrón de sensibilidad a los antifúngicos frente a las diferentes especies de *Trichosporon* y no hay datos de referencia en los documentos del CLSI. Paphitou *et al*, [32] en 2002, reportaron que las especies de *Trichosporon* mostraron baja actividad *in vitro* frente a AMB y una alta actividad frente a algunos triazoles (VRZ, posaconazol y ravuconazol); otros autores encontraron que *Trichosporon* spp. fue resistente a AMB y 5-fluorocitosina, lo que provocó una alta mortalidad (hasta del 80%) en pacientes que fueron tratados con estos antifúngicos. [22, 52] En cambio los azoles, han presentado una mejor actividad *in vitro* contra especies de *Trichosporon*, ya demostrado por diferentes autores, como Ramos *et al*, [39] en 2004 reportaron alta actividad *in vitro* de VRZ frente a aislados clínicos de *Trichosporon*. Silva *et al*, [44] en 2003 describieron CMI en rango de sensibilidad a FLZ y S-DD frente ITZ y KTZ en pacientes con infección urinaria nosocomial causada por *T. asahii*. En el presente estudio, se observó la menor actividad de a ITZ y TRB sobre *Trichosporon* spp., ambos en el 34.8% y el AMB 17.4%,



cuyo intervalo de CMI fue de 1 a 4 μ g/mL y de 2 a 4 μ g/mL, respectivamente, independientemente de la especie de *Trichosporon*. Este hallazgo lo interpretamos como la mayor resistencia de *Trichosporon* frente a ITZ y TRB seguido por AMB. Contrario a lo descrito por otros autores en donde la menor actividad antifúngica se observó con AMB. [30, 41, 48, 52] Esto demuestra que existe una variabilidad en la sensibilidad de los antifúngicos frente a este agente, lo que puede explicar la pobre respuesta que presentan los pacientes tratados con estos antifúngicos.

Ante estos hallazgos es importante que cuando se presenten pacientes con micosis causadas por las diferentes especies de *Trichosporon*, antes de indicar un tratamiento es necesario realizar pruebas de sensibilidad a antifúngicos para lograr una mejor respuesta terapéutica.



VI. CONCLUSIONES

- ♦ Es importante realizar las diferentes pruebas morfológicas, fisiológicas para la identificación de las especies de *Trichosporon*, por la variabilidad morfológica macroscópica y microscópica que llega a observarse y puede confundirse con otros hongos causantes de micosis emergentes.
- ♦ Existe variabilidad morfológica, macroscópica como microscópica, aun tratándose de la misma especie de *Trichosporon*, ya que existen varios morfotipos, independientes de las especie.
- ♦ *T. asahii*, es la especie que predominó en las infecciones superficiales en pacientes inmunocompetentes.
- ♦ KTZ, VRZ y FLZ presentaron la mayor actividad antifúngica que AMB sobre las diferentes especies de *Trichosporon*.
- ♦ Por la mayor actividad de VRZ frente a *Trichosporon*, podría ser una buena alternativa para el tratamiento, principalmente de las infecciones diseminadas.



VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad S, Al-Mahmeed M, Khan ZU. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. J Med Microbiol 2005;54:639-646.
2. Arce M, Arenas R. Dermatological infections by *Trichosporon beigeli*: a retrospective study of 13 cases in immunocompetent patients. An Bras Dermatol 1998;73:13-15.
3. Archer-Dubon C, Orozco-Topete R, Leyva-Santiago J, Arenas R, Carbajosa J, Ysunza A. Superficial mycotic infections of the foot in a native pediatric population: a pathogenic role for *Trichosporon cutaneum*?. Pediatr Dermatol 2003;20:299-302.
4. Arenas R. *Piedras*. En: Micología Médica ilustrada. 3ª Edición Mc Garw – Hill México, páginas 106 – 111, 2008
5. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and identification. 3th ed. Cambridge University Press, 2000.
6. Bonifaz A. *Piedras*. En: Micología Médica Básica. 2ª Edición. Méndez Editores. México, páginas: 119 – 126, 2000
7. Chowdhary A, Ahmad S, Khan ZU, Doval DC, Randhawa HS. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: A case report and an update. Indian J Med Microbiol 2004;22:16-22.
8. Di Bonaventura, Pompilio A, Picciani C, Iezzi M, D'Antonio D, Piccolomini R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: Development, architecture, and antifungal resistance. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:3269-3276.



9. Diaz MR, Fell JW. High-Throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *Trichosporon*. J Clin Microbiol 2004;42:3696-3706.
10. Ellner K, McBride ME, Rosen T, Berman D. Prevalence of *Trichosporon beigelli*. Colonization of normal perigenital skin. J Med Vet Mycol 1991;29:99-103.
11. Elmer KB, Eltson DM, Libow LF. *Trichosporon beigeli*. Infection presenting as white piedra and onychomycosis in the same patient. Cutis 2002;70:209 - 211.
12. Espinel – Ingroff A, Barchiesi F, Hazen KC, Martínez – Suárez JV, Scalise G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. Med Mycol 1998;38 (suppl 1):68-78 .
13. Fusaro RM, Miller NG. Onychomycosis caused by *Trichosporon cutaneum* in the United States. J Am Acad Dermatol 1984;11:747-749.
14. Greenberg RG, Berger TG. Postoperative *Trichosporon beigeli* soft tissue infection. J Dermatol Surg Oncol 1998;15:432-434.
15. Guého E, Smith MT, de Hoog GS, Billon – Grand G, Christen R, Batenburg – Van der Vegte WH. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. Antonie Van Leeuwenhoek 1992;61:289-316
16. Gunduz T, Metin DY, Sacar T, Hilmioglu S, Baydur H, Inci R, Tümbay E. Onychomycosis in primary school children: association with socioeconomic conditions. Mycoses 2006;49:431-433.
17. Han MH, Choi JH, Sung KJ, Moon KC, Koh JK. Onychomycosis and *Trichosporon beigeli* in Korea. Int J Dermatol 2000;39:266-269.
18. Khandpur S, Reddy BS. Itraconazol therapy for white piedra affecting scalp hair. J Am Acad Dermatol 2002;47:415-418.



19. Kim YJ, Kim SI, Kim YR, Park YM, Park YJ, Kang MW. Successful treatment of septic shock with purpura fulminans caused by *Trichosporon asahii* in an immunocompetent patient. *Ann Clin Lab Sci* 2007;37:366-369.
20. Lascaux AS, Bouscarat F, Descamps V, Casalino E, Picard-Dahan C, Crickx B, Belaich S. Cutaneous manifestations during disseminated trichosporonosis in an AIDS patient. *Ann Dermatol Venereol* 1998;125:111-113.
21. Lee JW, Melcher GA, Rinaldi MG, Pizzo PA, Walsh TJ. Patterns of morphologic variation among isolates of *Trichosporon beigellii*. *J Clin Microbiol* 1990;28:2823-2827.
22. Lo Passo C, Pernice I, Celeste A, Perdichizzi G, Todaro-Luck F. Transmission of *Trichosporon asahii* oesophagitis by contaminated endoscope. *Mycoses* 2001;44:13-21.
23. López Martínez R, Hernández Hernández F. *Micosis superficiales. Piedras*. En: *Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Editorial Trillas. México. páginas: 50 – 52. 2004
24. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Palacios-Morales Y, Córdova-Martínez E, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. *Mycopathol* 2008;166:41-5.
25. Mc Ginnins MR. *Laboratory Handbook of Medical Mycology. Yeast identification*. Academic Press, New York, 1980. pp.: 337 – 410.
26. Morales-Trujillo ML, Arenas R, Arroyo S. Eritrasma interdigital: datos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos. *Actas Dermosifiliogr* 2008;99:469-473.



27. Morera-López Y, Torres-Rodríguez JM, Jiménez-Cabello T. Estudio de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de mohos y levaduras a itraconazol y voriconazol. *Rev Iberoam Micol* 2005;22:105-109.
28. Mügge C, Hausteil UF, Nenoff P. Causative agents of onychomycosis a retrospective study. *Dtsch Dermatol Ges* 2006;4:218-228.
29. Nakagawa T, Nakashima K, Takaiwa T, Nagayama K. *Trichosporon cutaneum* (*Trichosporon asahii*) infection mimicking hand eczema in a patient with leukemia. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:929-931.
30. Nahass GT, Rosenberg SP, Leonardi CL, Penneys NS. Disseminated infection with *Trichosporon beigellii*. Report of a case and review of the cutaneous and histologic manifestations. *Arch Dermatol* 1993;129:1020-1023.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standards. 2ª Ed. M27 – A2. Wayne (PA). National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
32. Paphitou N, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1144-1146.
33. Piérard GE, Read D, Piérard-Franchimont C, Lothar Y, Rurangirwa A, Arrese-Estrada J. Cutaneous manifestation in systemic trichosporonosis. *Clin Exp Dermatol* 1992;17:79-82.
34. Pini G, Faggi E, Donato R, Fanci R. Isolation of *Trichosporon* in a hematology ward. *Mycoses* 2005;48:45-49.



35. Pires MC, Ribeiro CA, Peres – Toledo R, Mohalen DF, Maranhao WM. Onicomycosis by *Trichosporon beigeli*: a case report. *An Bras Dermatol* 1995;70:457-459.
36. Pitchard RC, Muir DB. *Trichosporon beigeli*: survey of isolates from clinical material. *Pathology* 1985;17:20-23.
37. Pontes ZB, Lima Ede O, Oliveira NM, Dos Santos JP, Ramos AI, Carvalho MF. Onychomycosis in João Pessoa city, Brazil. *Rev Argent Microbiol* 2002;34:95-99.
38. Pulvirenti N, Dall'Oglio F, Greco AM, Oliveri S, Schwartz RA, Micali G. Superficial cutaneous *Trichosporon asahii* infection in an immunocompetent host. *Int J Dermatol* 2006;45:1428-1431.
39. Ramos JM, Cuenca-Estrella M, Gutierrez F, Elia M, Rodriguez-Tudela JL. Clinical case of endocarditis due to *Trichosporon inkin* and antifungal susceptibility profile of the organism. *J Clin Microbiol* 2004;42:2341-2344.
40. Reddy BT, Torres HA, Kontoyiannis DP. Breast implant infection caused by *Trichosporon beigeli*. *Scand J Infect Dis* 2002;34:143-144.
41. Rippon JW. *Micología Médica: Hongos y actinomicetos patógenos*. 3ª Edición. Editorial Interamericana McGraw Hill. México, 1998. pág. 179-185.
42. Rivera P, Hernández F, Santamaría S, Salas I, García J. Diagnóstico diferencial de infecciones sistémicas por *Trichosporon beigeli*. *Rev Costarric Cienc Med* 2003;24:63-70.
43. Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R, Rodríguez-Alvarez M, Monroy E, Fernández R. *Tinea pedis* and Onychomycosis in Children of the Mazahua Indian Community in Mexico. *Gac Med Mex*. 2003;139:215-20.



44. Silva V, Zepeda G, Alvarado D. Infección urinaria nosocomial por *Trichosporon asahii*. Primeros dos caso en Chile. Rev Iberoam Micol 2003;20:21-23.
45. Sood S, Pathak D, Sharma R, Rishi S. Urinary tract infection by *Trichosporon asahii*. Indian J Med Microbiol 2006;24(4):294-296.
46. Stenderup A, Schonheyder H, Ebbesen P, Melbye M. White piedra and *Trichosporon beigeli* carriage in homosexual men. J Med Vet Mycol 1986; 24:401-406.
47. Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T, Kume H. Taxonomic position of deep-seated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from trichosporonosis patients. J Clin Microbiol 1995;33:1368-1370.
48. Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, Shinoda T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. J Clin Microbiol 1999;37:1985-1993.
49. Svejgaard EL, Nilsson J. Onychomycosis in Denmark: prevalence of fungal nail infection in general practice. Mycoses. 2004;47:131-5
50. Topley and Wilson's. De Hoog GS, Guého E. Agents of white piedra, black piedra and *tinea nigra*. En: Microbiology and microbial infections vol. 4 Medical mycology. 9th ed. Arnold Publishers Ltd. London, 1998. pp.: 191-194.
51. Vanden BH. Mechanisms of antifungal resistance. Rev Iberoam Micol 1997;14:44-49.





52. Walsh TJ, Melcher GA, Rinaldi MG, Lecciones J, McGough DA, Kelly P, Lee JW, Callender D, Rubin M, Pizzo PA. *Trichosporon beigelii*: an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1990;28:1616-1622.
53. Watson KC, Kallichurram S. Brain abscess due to *Trichosporon cutaneum*. *J Med Microbiol* 1970;9:191-193.
54. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:382-402.
55. Wolf DG, Falk R, Hacham M, Theelen B, Boekhout T, Scorzetti G, Shapiro M, Block C, Salkin IF, Polacheck I. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. *J Clin Microbiol* 2001;39:4420-4425.
56. Yun SJ, Lee JB, Shin MG, Kim SJ, Won YH, Lee SC. Cutaneous abscess by *Trichosporon asahii* developing on a steroid injection site in a healthy adult. *Clin Exp Dermatol* 2006;31:545-547.



VIII. APÉNDICE

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute
NCCLS: Nacional Committee Clinical Laboratory Standars
ATCC: American Type Culture Collection
RPMI: Roswell Park Memorial Instutite
KTZ: Ketoconazol
ITZ: Itraconazol
VRZ: Voriconazol
FLZ: Fluconazol
AMB: Anfotericina B
TRB: Terbinafina
NaOH: Hidróxido de sodio
NaCl: Cloruro de sodio
KOH: Hidróxido de sodio
MOPS: Ácido morfolinopropanosulfónico
ADS: Agar dextrosa Sabouraud
AHM: Agar harina de maíz
AEM: Agar extracto de malta
ADS – A: Agar Dextrosa Sabouraud con antibiótico
APD: Agar papa dextrosa
DMSO: Dimetilsulfóxido
ADN: Ácido desoxiribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal
DMT2: Diabetes mellitas tipo 2
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
S: Sensible
R: Resistente
S-DD: Sensible Dosis Dependiente
YPD: Yeast Peptona Dextrosa



ANEXOS

9.1 MEDIOS DE CULTIVO

Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) o Sabouraud simple.

Composición:

♦ Peptona	10g
♦ Glucosa	20g
♦ Agar – agar	20g
♦ Agua destilada	1000mL

Procedimiento: disolver los ingredientes en el agua y dejar reposar durante 10 minutos, ajustar pH a 5.6. Se esteriliza por 15 minutos a 121°C.

Agar Dextrosa Sabouraud – Antibióticos (Sabouraud antibiótico).

Composición:

♦ Peptona	10g
♦ Glucosa	20g
♦ Agar – agar	20g
♦ Cloranfenicol	500mg
♦ Cicloheximida	500mg
♦ Agua destilada	1000mL

Procedimiento: se disuelven en el agua los primeros tres ingredientes, ajustar pH a 5.6 y dejar reposar por 10 minutos. Se esteriliza durante 15 minutos a 121°C y se deja enfriar a 50°C aproximadamente. En un ambiente estéril se agregan los antibióticos.



Agar Papa Dextrosa (APD).

Composición:

- | | |
|------------------|--------|
| ♦ Pulpa de papa | 250g |
| ♦ Glucosa | 20g |
| ♦ Agar – agar | 20g |
| ♦ Agua destilada | 1000mL |

Procedimiento: pelar y cortar la papa en trozos finos, poner a ebullición durante 30 minutos. Filtrar a través de una gasa y reponer el volumen anterior. Añadir la glucosa y el agar. Disolver por calentamiento y esterilizar a 121°C por 20 minutos. Envasar la mezcla.

Agar Harina de Maíz – Tween 80.

Composición:

- | | |
|------------------|--------|
| ♦ Harina de maíz | 62.5g |
| ♦ Agua destilada | 1000mL |
| ♦ Tween 80 | 15mL |
| ♦ Agar | 19g |

Procedimiento: disolver la harina de maíz en el agua destilada, dejar reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. Añadir el agar y el Tween 80. Esterilizar por 20 minutos a 121°C.



Agar YPD.

Composición:

♦ Extracto de levadura	10g
♦ Peptona	20g
♦ Dextrosa	20g
♦ Agar	15g
♦ Agua destilada	1000mL

Procedimiento: mezclar todos los componentes de la fórmula y llevar a ebullición durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Agar dextrosa – urea

Composición:

♦ Dextrosa	1g
♦ Peptona	1g
♦ Cloruro de sodio	5g
♦ Fosfato monopotásico	2g
♦ Urea	20g
♦ Agar	15g
♦ Rojo de fenol	12mg
♦ Agua destilada	1000mL

Procedimiento: disolver la urea en 100mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Disolver los ingredientes restantes en 900mL de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 20 minutos, enfriar a 50°C. Agregar la solución de urea en ambiente estéril.





RPMI – Líquido.

Composición:

♦ RPMI 1640	10g
♦ MOPS	34.5g
♦ Glucosa	0.2g
♦ Agua ultrapura (QP)	1000mL

Procedimiento: disolver los ingredientes en el agua a temperatura ambiente, mantener en agitación. Llevar a pH 7 con NaOH 1M. Esterilizar por filtración. Colocar en envase oscuro.



9.2 TÉCNICAS DELABORATORIO.

Tinción con Azul de algodón – lactofenol.

Consiste en depositar una gota de colorante sobre un portaobjetos y, sobre ella, colocar un fragmento pequeño del cultivo por estudiar, dilacerándolo perfectamente para poder hacer una buena observación. Se coloca un cubreobjetos sobre la preparación y se procede a la observación de la misma.

Técnica de microcultivo

- a) En la base de una caja Petri se colocó una varilla de vidrio en forma de “V” (caballete).
- b) Sobre la varilla se fijó un portaobjeto con ayuda de cinta adhesiva. Depositando en la misma caja un cubreobjeto.
- c) Se esterilizó el material durante 15 minutos a 15 libras de presión.
- d) Se prepararon cajas de Petri con el medio de cultivo ADS y AHM de aproximadamente 5 a 7 mm de espesor.
- e) Se cortó el medio en cuadros de 1 cm por lado, aproximadamente, con ayuda de un bisturí estéril.
- f) En área estéril, se colocó un cuadro de ADS al centro del portaobjetos de la caja Petri.
- g) Se inocula en cada uno de los lados del fragmento del medio una pequeña porción del aislamiento y se colocó el cubreobjeto sobre el medio inoculado.
- h) Se adicionan 10 mL de agua glicerinada al 10%, teniendo cuidado de no mojar el cultivo.
- i) Se incuban a oscuridad durante 48 horas a 28°C.
- j) Se retiró el cubreobjeto y se colocó sobre un portaobjeto limpio en el que previamente se colocó una gota de azul de algodón.
- k) Se retiró y se desechó el fragmento de medio de cultivo del portaobjetos; se deposita al centro del portaobjetos una gota de azul de algodón y se colocó un cubreobjeto nuevo.



- l) Para conservar la preparación, se sellan los bordes de los cubreobjetos con resina o barniz de uñas transparente.

Observación y lecturas se registraron en una hoja de reporte, la forma, tamaño, disposición de los conidios y formación de pseudohifas.

Técnica de Dalmau.

1. Se dividió una caja Petri con AHM 1% Tween 80, en cada división un cultivo.
2. Con una asa estéril tocar ligeramente la colonia de la levadura, y hacer 2 líneas separadas de aproximadamente 3.5 cm de largo y a 1.2cm de separación.
3. Esterilizar el asa y enfriar. Pasar el asa estéril, de un lado a otro sobre las dos líneas, diluyendo el inóculo. No perforar el agar.
4. Con unas pinzas de disección, colocar un cubreobjeto de 22 mm sobre las líneas de inoculación.
5. Incubar a 28°C durante 72 horas.

Remover la tapa de la caja Petri y colocar la placa en el microscopio para su observación directa, colocando el objetivo en el borde del cubreobjeto. Examinar cuidadosamente las áreas con el objetivo de 40x. Valorar la forma, tamaño y disposición de los conidios y otras estructuras.

