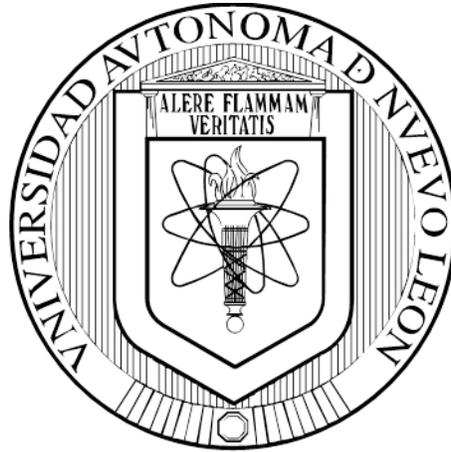


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**CORRELACIÓN ENTRE LA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y  
MOLECULAR CON LA VIRULENCIA DE DIVERSOS  
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL GÉNERO *Trichosporon***

**POR**

**ALEXANDRA MARGARITA MONTOYA MENDOZA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**AGOSTO 2016**

**CORRELACIÓN ENTRE LA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR  
CON LA VIRULENCIA DE DIFERENTES AISLAMIENTOS  
CLÍNICOS DEL GÉNERO *Trichosporon***

Aprobación de la Tesis:

---

Dra. C. Gloria María González González  
Directora de Tesis

---

Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco  
Co-director de Tesis

---

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas  
Miembro de la Comisión

---

Dr. C. José Prisco Palma Nicolás  
Miembro de la Comisión

---

Dr. C. Romel Hernández Bello  
Miembro de la Comisión

---

Dra. Med. Raquel Garza Guajardo  
Sub-directora de Estudios de Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Gloria M. Gonzáles

Al Dr. Adrián Rosas Taraco

A los miembros de mi comisión

A Roge, Caro y Sonia

Al Dr. Alberto Gómez Treviño

A la Dra. Raquel Ballesteros Elizondo

A mis compañeros de laboratorio

A todos los que contribuyeron para la realización es este proyecto

## **DEDICATORIA**

A Carlos, Carolina y Natalia.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN . . . . .	1
1.1 Micosis oportunistas . . . . .	1
1.2 Género <i>Trichosporon</i> . . . . .	2
1.2.1 Antecedentes históricos . . . . .	2
1.2.2 Características generales del género <i>Trichosporon</i> . . . . .	3
1.2.3 Especies de <i>Trichosporon</i> de importancia clínica . . . . .	4
1.3 Infecciones asociadas a <i>Trichosporon</i> spp. . . . .	4
1.3.1 Piedra blanca . . . . .	5
1.3.2 Onicomicosis. . . . .	6
1.3.3 Tricosporonosis . . . . .	7
1.3.4 Tratamiento de las infecciones por <i>Trichosporon</i> spp. . . . .	8
2. ANTECEDENTES. . . . .	10
2.1 Identificación de <i>Trichosporon</i> spp. . . . .	10
2.1.1 Identificación morfológica . . . . .	10
2.1.2 Identificación bioquímica. . . . .	11
2.1.3 Identificación molecular . . . . .	11
2.2 Factores de virulencia . . . . .	12
2.2.1 Producción de compuestos líticos . . . . .	12
2.2.2 Formación de biopelículas. . . . .	13
2.3 Susceptibilidad a antifúngicos . . . . .	14
2.3.1 Susceptibilidad de células planctónicas . . . . .	14
2.3.2 Susceptibilidad de biopelículas . . . . .	16
2.4 Patogenicidad <i>in vivo</i> . . . . .	17
2.4.1 Modelos murinos de tricosporonosis . . . . .	17
2.4.2 Persistencia de estructuras fúngicas en órganos . . . . .	19
2.4.3 Daño tisular . . . . .	20
2.5 Respuesta inmune del hospedero . . . . .	20
3. JUSTIFICACIÓN . . . . .	23
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS . . . . .	24

Capítulo	Página
4.1 Hipótesis . . . . .	24
4.2 Objetivos . . . . .	24
4.2.1 Objetivo general . . . . .	24
4.2.2 Objetivos específicos . . . . .	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .	26
5.1 Aislamientos de <i>Trichosporon</i> spp. . . . .	26
5.2 Identificación de aislamientos. . . . .	26
5.2.1 Morfología . . . . .	26
5.2.2 Prueba de la urease . . . . .	27
5.2.3 Asimilación de carbohidratos . . . . .	27
5.2.4 Identificación molecular y genotipificación . . . . .	28
5.2.4.1 Extracción de ADN . . . . .	28
5.2.4.2 Amplificación de las regiones IGS1 e ITS1-5.8S-ITS2 . . . . .	29
5.2.4.3 Electroforesis de ADN . . . . .	30
5.2.4.4 Estimación del tamaño de fragmentos de ADN . . . . .	30
5.2.4.5 Purificación de productos de PCR . . . . .	31
5.2.4.6 Secuenciación . . . . .	31
5.2.4.7 Identificación y genotipificación. . . . .	31
5.3 Determinación de factores de virulencia . . . . .	32
5.3.1 Compuestos líticos . . . . .	32
5.3.1.1 Gelatinasa . . . . .	32
5.3.1.2 ADNasa . . . . .	33
5.3.1.3 Hemolisina, fosfolipasa, aspartil-proteasa y esterasa. . . . .	33
5.3.2 Biopelículas . . . . .	34
5.3.2.1 Producción de biopelículas . . . . .	34
5.3.2.2 Cuantificación de biopelículas . . . . .	35
5.4 Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos . . . . .	36
5.4.1 Pruebas de susceptibilidad para células planctónicas . . . . .	36
5.4.2 Pruebas de susceptibilidad para biopelículas . . . . .	37
5.5 Modelo murino de tricosporonosis . . . . .	38
5.5.1 Animales . . . . .	38
5.5.2 Preparación de inóculos . . . . .	39
5.5.3 Modelo de infección sistémica . . . . .	39
5.5.4 Análisis de carga fúngica tisular . . . . .	40
5.5.5 Histopatología . . . . .	40
5.5.5.1 Procesamiento de tejidos en inclusión en bloques de parafina . . . . .	40

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
5.5.5.2 Obtención de cortes histológicos . . . . .	41
5.6 Cuantificación de citocinas en suero . . . . .	41
5.6.1 Procesamiento de muestras de sangre . . . . .	41
5.6.2 Cuantificación de IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-10 . . . . .	41
5.6.3 Cuantificación de G-CSF . . . . .	42
5.7 Análisis estadístico . . . . .	43
6. RESULTADOS . . . . .	44
6.1 Información demográfica de aislamientos de <i>Trichosporon</i> spp. . . . .	44
6.2 Identificación fenotípica y molecular . . . . .	46
6.2.1 Morfología . . . . .	46
6.2.2 Perfil bioquímico . . . . .	48
6.2.3 Identificación molecular y genotipificación . . . . .	51
6.2.4 Morfología, perfil bioquímico y origen clínico por especie y genotipo . . . . .	55
6.3 Producción de factores de virulencia <i>in vitro</i> . . . . .	60
6.3.1 Compuestos líticos . . . . .	60
6.3.2 Producción de biopelículas . . . . .	62
6.3.3 Perfiles <i>in vitro</i> de factores de virulencia . . . . .	66
6.4 Susceptibilidad a antifúngicos . . . . .	66
6.4.1 Susceptibilidad de células planctónicas . . . . .	66
6.4.2 Susceptibilidad de biopelículas . . . . .	67
6.5 Estudios <i>in vivo</i> . . . . .	69
6.5.1 Modelo murino . . . . .	69
6.5.2 Análisis de carga fúngica tisular . . . . .	70
6.5.3 Histopatología . . . . .	71
6.6 Producción de citocinas en suero . . . . .	74
7. DISCUSIÓN . . . . .	76
8. CONCLUSIONES . . . . .	90
REFERENCIAS . . . . .	92

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Infecciones causadas por <i>Trichosporon</i> spp., principales manifestaciones clínicas y factores de riesgo . . . . .	5
2. Resumen de estudios de sobrevivencia en modelos murinos de tricosporonosis . . . . .	.17
3. Iniciadores empleados para la amplificación de las regiones IGS1 e ITS1-5.8S-ITS2 . . . . .	.29
4. Condiciones empleadas para las reacciones de amplificación de las regiones IGS1 e ITS1-5.8S-ITS2 . . . . .	.30
5. Cepas tipo de <i>Trichosporon</i> sp. empleadas para la alineación e identificación de los aislamientos clínicos . . . . .	32
6. Procesamiento de tejidos . . . . .	40
7. Perfiles de asimilación de carbohidratos obtenidos para los aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. y <i>Candida</i> sp. . . . .	50
8. Identificación de aislamientos clínicos por asimilación de carbohidratos y secuenciación . . . . .	54
9. Asimilación de carbohidratos de aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	59
10. Actividad lítica de los aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	61
11. Fenotipo productor de biopelículas de los aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	63
12. Distribución del fenotipo productor de biopelículas en base al origen clínico de los aislamientos . . . . .	64

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
13. Perfiles <i>in vitro</i> de factores de virulencia de los aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	66
14. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de células planctónicas de aislamientos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	67
15. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de células planctónicas y biopelículas en base al fenotipo productor . . . . .	68
16. Perfiles enzimáticos de los tres aislamientos de <i>T. asahii</i> incluidos en el modelo murino . . . . .	69
17. Carga fúngica en tejido de ratones infectados intravenosamente con $1 \times 10^6$ UFC/ratón . . . . .	70
18. Citocinas en suero de ratones BALB/c infectados intravenosamente con $1 \times 10^6$ UFC/ratón evaluadas los días 1 y 7 post-infección . . . . .	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución de los agentes etiológicos de micosis oportunistas más frecuentemente aislados . . . . .	2
2. Información demográfica de los aislamientos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	45
3. Morfologías coloniales representativas de los aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	46
4. Morfologías microscópicas representativas de los diversos aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	47
5. Morfologías representativas de las diversas artroconidias presentes en los aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	48
6. Distribución de los aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. en base a la producción de ureasa . . . . .	48
7. Gel de agarosa representativo de los fragmentos IGS1 amplificados . . . . .	51
8. Gel de agarosa representativo de los fragmentos ITS1-5.8S-ITS2 amplificados . . . . .	52
9. Distribución de aislamientos de <i>Trichosporon</i> sp. en base a la identificación molecular . . . . .	53
10. Distribución de genotipos de <i>T. asahii</i> por secuenciación de la región IGS1 . . . . .	54
11. Morfología colonial de aislamientos clínicos de <i>T. asahii</i> . . . . .	56
12. Morfología colonial de aislamientos clínicos de TSNI . . . . .	57
13. Morfología microscópica de aislamientos clínicos de TSNI . . . . .	58

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
14. Morfología colonial y microscópica de aislamientos clínicos de <i>T. dermatis</i> . . . . .	58
15. Origen clínico de los aislamientos de <i>T. asahii</i> y TSNI . . . . .	60
16. Evaluación <i>in vitro</i> de ADNasa, hemolisina, aspartil-proteasa y esterasa . . . . .	61
17. Producción de biopelículas de aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. . . . .	62
18. Producción de biopelículas de los aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> sp. empleando diferentes fases de adhesión . . . . .	64
19. Fenotipos productores de biopelículas obtenidos con diferentes fases de adhesión . . . . .	65
20. Secciones representativas de riñón, bazo e hígado de ratones BALB/c infectados intravenosamente con $1 \times 10^6$ UFC/ratón evaluadas el día 1 post-infección. Tinción hematoxilina-eosina . . . . .	72
21. Secciones representativas de riñón, bazo e hígado de ratones BALB/c infectados intravenosamente con $1 \times 10^6$ UFC/ratón evaluadas el día 7 post-infección. Tinción Grocott-Gomori . . . . .	73

## RESUMEN

Alexandra Margarita Montoya Mendoza

Fecha de graduación: Agosto 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título de estudio: CORRELACIÓN ENTRE LA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR CON LA VIRULENCIA DE DIFERENTES AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL GÉNERO *Trichosporon*

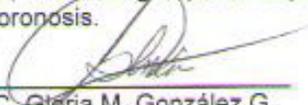
Número de páginas: 101

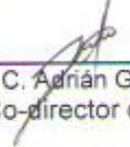
Candidata para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica

**Área de estudios:** Microbiología Médica

**Propósito y Método de Estudio:** *Trichosporon* spp. es un hongo oportunista que coloniza la piel y tractos gastrointestinal y respiratorio. Estos microorganismos tienen una amplia distribución geográfica y se ha reportado su resistencia *in vitro* ante antifúngicos de uso común. Se han descrito 6 especies de relevancia clínica en humanos, y a pesar de ser consideradas una causa importante de infecciones diseminadas después de *Candida* spp., existe poca información relacionada a sus factores de virulencia y patogenicidad *in vivo*. El presente trabajo tiene como fin determinar la producción *in vitro* de compuestos líticos extracelulares y biopelículas, así como desarrollar un modelo murino de tricosporonosis diseminada en ratones inmunocompetentes para la evaluación *in vivo* de la patogenicidad de tres aislamientos de *T. asahii* con diferentes perfiles de virulencia.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se determinó que *T. asahii* genotipo I es el genotipo más predominante en este estudio. Respecto a los factores de virulencia, determinamos la producción de aspartil-proteasas por parte de *T. asahii*, y la producción de ADNasa y biopelícula por parte de las tres especies evaluadas. Además, demostramos que la formación de biopelículas estuvo asociada al aumento de la resistencia contra antifúngicos. No se observó una correlación entre la caracterización fenotípica y molecular y la virulencia de diversos aislamientos clínicos de *Trichosporon*. Fue posible evidenciar, sin embargo, que la respuesta inmune innata es suficiente para el control de la tricosporonosis.

  
Dra. C. Gloria M. González G.  
Directora de Tesis

  
Dr. C. Adrián G. Rosas T.  
Co-director de Tesis

# CAPÍTULO 1

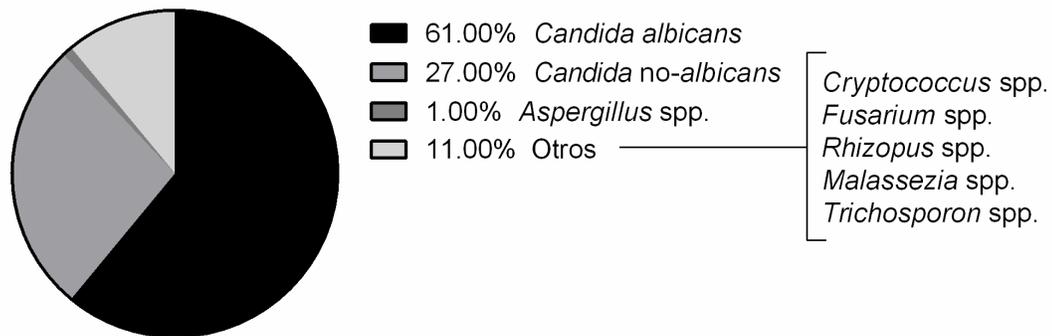
## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Micosis oportunistas

La frecuencia de micosis oportunistas, particularmente la categoría de las infecciones invasivas, ha incrementado significativamente desde la década de los 80<sup>1-5</sup>. Este incremento está asociado a un aumento en la morbilidad y mortalidad<sup>2,5-8</sup> de los individuos, y está relacionada al mayor número de pacientes en riesgo de desarrollar alguna infección fúngica severa. Los grupos de riesgo incluyen a pacientes que han recibido transplantes, cirugías, con VIH o alguna enfermedad hematológica, de edad avanzada, infantes prematuros, o que estén recibiendo algún tipo de inmunosupresión<sup>2-5,8-11</sup>.

Si bien la mayoría de las micosis oportunistas ocurren por infección con *Candida albicans*, otros microorganismos han adquirido importancia como agentes en este tipo de infecciones. La Figura 1 muestra la distribución por género de agentes causales micosis oportunistas. Dentro del grupo de estos patógenos emergentes se encuentran algunas especies del género *Trichosporon*, que previamente se consideró un microorganismo no patógeno, pero ahora son reconocidos como causas importantes de enfermedades oportunistas en los grupos de pacientes vulnerables ya mencionados. Además,

se ha observado que estos microorganismos son resistentes o menos susceptibles a los antifúngicos empleados comúnmente en la terapia<sup>12</sup>. Debido a ésto, el tratamiento de infecciones causadas por *Trichosporon* spp. representa un reto en el escenario clínico, lo que genera un interés en el estudio de este microorganismo.



**Figura 1. Distribución de los agentes etiológicos de micosis oportunistas más frecuentemente aislados.**

## 1.2 Género *Trichosporon*

### 1.2.1 Antecedentes históricos

*Trichosporon* spp. fue descrito por primera vez por Beigel en 1865 como el agente responsable de una infección benigna del cabello llamada piedra blanca. Beigel clasificó al microorganismo como un alga y lo ubicó taxonómicamente en el género *Pleurococcus*<sup>13</sup>. El nombre *Trichosporon* deriva del griego *trichos*, que significa pelo y *sporon*, que significa espora, en relación a los nódulos formados en el pelo durante la piedra blanca. Fue hasta 1890 que Behrend identificó al microorganismo causante de la piedra blanca como un hongo al que llamó

*Trichosporon ovoides*<sup>14</sup>. En 1902, Vuillemin propuso la denominación *Trichosporon beigeli*, en la que se agrupó a todas las especies de *Trichosporon* descritas en esa fecha<sup>15</sup>. Por décadas, este término fue empleado para designar a los agentes patógenos pertenecientes al género.

En la década de los 80's, ya que *Trichosporon* había adquirido importancia clínica, esfuerzos de diversos investigadores se enfocaron en realizar una revisión taxonómica del microorganismo. Aquí se debe hacer mención de la relevancia que tuvo el trabajo de Guého y cols. que, empleando diversos métodos moleculares, culminó con una re-estructuración filogenética del género. Estos análisis confirmaron que *Trichosporon* es un grupo complejo formado por diferentes especies con nichos ecológicos definidos y con características morfológicas y fisiológicas similares<sup>13,16,17</sup>.

### 1.2.2 Características generales del género *Trichosporon*

*Trichosporon* spp. pertenece al filo de los Basidiomicetos. Es un hongo levaduriforme caracterizado macroscópicamente por formar colonias de crecimiento radial. Estas colonias pueden ser blancas o amarillo claro, de textura suave, cremosa, cerebriforme, harinosa o húmeda. Microscópicamente, el hongo forma hifas hialinas septadas, con abundantes artroconidias y blastoconidias. En relación a su fisiología, estos microorganismos son capaces de asimilar una variedad de carbohidratos y otras fuentes de carbono; sin embargo; no poseen capacidad fermentativa. Una de las principales características del género es su capacidad para hidrolizar urea<sup>15,18-20</sup>.

Estos microorganismos tienen una distribución mundial. Aunque son principalmente saprófitos, comúnmente se encuentran colonizando la piel y los tractos digestivo y respiratorio de humanos<sup>18,19</sup>.

### 1.2.3 Especies de *Trichosporon* de importancia clínica

A la fecha, se han descrito más de 50 especies de *Trichosporon*, de las cuales 16 se han asociado a enfermedades en humanos. Guého y cols. tipificaron a las especies que mostraban una mayor adaptabilidad al cuerpo humano: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* y *T. ovoides*. Estas 6 especies, reclasificadas a partir del taxón *T. beigellii*, se consideran las especies de mayor relevancia clínica a la fecha<sup>21</sup>.

## **1.3 Infecciones asociadas a *Trichosporon* spp.**

La Tabla 1 resume las principales manifestaciones clínicas y factores de riesgo en infecciones causadas por *Trichosporon* spp.

**Tabla 1. Infecciones causadas por *Trichosporon* spp., principales manifestaciones clínicas y factores de riesgo.**

Infección	Principales agentes	Transmisión	Manifestación clínicas	Principales factores de riesgo y condiciones asociadas	Tratamiento
Piedra blanca	<i>T. cutaneum</i> , <i>T. inkin</i> , <i>T. ovoides</i>	Exógeno	Nódulos blancos alrededor del pelo parasitado	Humedad y mala higiene	Rasurar el área afectada e imidazoles tópicos
Onicomycosis	<i>T. asahii</i> , <i>T. cutaneum</i> , <i>T. inkin</i> , <i>T. ovoides</i>	Exógeno	Engrosamiento y descoloración de las uñas	Humedad y mala higiene	Imidazoles tópicos
Tricosporonosis	<i>T. asahii</i> , <i>T. asteroides</i> , <i>T. mucoides</i>	Endógeno	Fiebre, fungemia, invasión a tejidos suaves	Neutropenia y uso de catéteres	No existe un tratamiento óptimo. Los triazoles han mostrado el mejor efecto inhibitorio <i>in vitro</i>

### 1.3.1 Piedra blanca

La presentación clínica asociada a *Trichosporon* spp. más conocida es la piedra blanca. Ésta es una infección crónica, asintomática, benigna y superficial, en la que se forman pequeños nódulos por adhesión de esporas a la cutícula del pelo y vello parasitados sin afectar la médula del pelo, cuero cabelludo o piel. Los nódulos son blancos, suaves, de bordes definidos, y miden aproximadamente entre 1 y 3 mm de diámetro<sup>19,22</sup>.

La piedra blanca afecta principalmente el pelo; sin embargo, esta infección se puede presentar en el vello de axilas, pubis y con menor frecuencia, en vello facial<sup>19</sup>. La piedra blanca de cabello afecta principalmente a mujeres y niños<sup>23,24</sup>. La mayoría de los casos de piedra blanca genital, segunda en incidencia, se da frecuentemente en hombres de 15 a 44 años de edad<sup>25,26</sup>.

La transmisión es exógena; se considera que el contacto directo con las esporas en el medio ambiente es suficiente para que inicie la parasitación. Su distribución geográfica es mundial; sin embargo, tiene mayor incidencia en climas tropicales y templados. Los factores de riesgo asociados son la humedad y poca higiene<sup>19</sup>.

*T. cutaneum*, *T. inkin* y *T. ovoides* han sido asociados frecuentemente a piedra blanca, siendo *T. ovoides* la especie con mayor incidencia en este tipo de infecciones<sup>18,27</sup>.

### 1.3.2 Onicomicosis

En los últimos años, han aumentado los casos de onicomicosis causados por *Trichosporon* spp. alrededor del mundo. Este hongo es el responsable del 1.3% al 10% de los casos de onicomicosis, siendo *T. asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin* y *T. mucoides* los microorganismos más frecuentemente involucrados<sup>28-30</sup>. Sin embargo, en México se ha calculado que *T. cutaneum* es responsable del 42% de los casos de onicomicosis y pie de atleta, un porcentaje muy por arriba del estimado para infecciones por dermatofitos y *Candida* spp., microorganismos típicamente responsables de las infecciones en el pie<sup>31</sup>.

Las onicomicosis causadas por *Trichosporon* spp. son infecciones superficiales y crónicas que se caracterizan por el engrosamiento y decoloración de las uñas. Al igual que con la piedra blanca, la humedad y mala higiene son los principales factores de riesgo<sup>19</sup>.

### 1.3.3 Tricosporonosis

*Trichosporon* spp. ha ganado importancia como agente causal de infecciones sistémicas oportunistas desde el primer caso de tricosporonosis invasiva en el cerebro, reportado en 1970<sup>32</sup>. La tricosporonosis se considera una enfermedad endógena, ya que el microorganismo se encuentra comúnmente colonizando la piel y los tractos gastrointestinal y respiratorio de los seres humanos<sup>18,19</sup>.

Las infecciones sistémicas por *Trichosporon* spp. alcanzan una mortalidad del 50% al 80%<sup>33</sup>, y están consideradas como la segunda o tercera causa en importancia después de candidemias en pacientes inmunocomprometidos, principalmente en aquellos con enfermedades hematológicas<sup>34–37</sup>. La neutropenia es el principal factor de riesgo. Se ha establecido la relación entre la tricosporonosis y los procedimientos médicos invasivos, como catéteres y sondas. Kontoyannis y cols. evaluaron los factores de riesgo asociados a las infecciones sistémicas por *Trichosporon* spp. en 17 pacientes con cáncer. Ellos observaron que de los 10 pacientes con fungemia, el 40% había desarrollado tricosporonosis posterior al uso de catéteres. La enfermedad base para la mayoría de los pacientes fue leucemia aguda y en el 65% de los casos se observó neutropenia. Algunos pacientes habían recibido quimioterapia (76%) o altas dosis de corticosteroides (89%) durante un mes previo al diagnóstico de tricosporonosis<sup>38</sup>. Girmenia y cols. realizaron un estudio retrospectivo incluyendo 287 casos de tricosporonosis. Ellos encontraron que el 62.8% de los pacientes había sufrido de alguna enfermedad hematológica previa al diagnóstico de tricosporonosis. La leucemia aguda tenía la mayor prevalencia (68%). Otras

condiciones de riesgo asociadas con el desarrollo de tricosporonosis fueron los tumores sólidos, trasplantes, diálisis peritoneal e infecciones por el virus de inmunodeficiencia adquirida<sup>39</sup>. Ruan y cols., en base a un estudio de 19 casos de tricosporonosis invasiva, reportaron el uso de catéteres centrales como el principal factor de riesgo (90%)<sup>33</sup>. Suzuki y cols. analizaron 33 pacientes con enfermedades hematológicas, reportando resultados similares a los anteriores: leucemia aguda (82%) y neutropenia (85%) fueron los principales factores de riesgo en infecciones sistémicas por *Trichosporon* spp. Además, observaron que la mayoría de los pacientes estaba bajo tratamiento de quimioterapia al momento del diagnóstico con esta micosis<sup>40</sup>.

Las principales manifestaciones de la tricosporonosis son la fiebre y fungemia. Sin embargo, se puede desarrollar una invasión a tejidos suaves. Se han reportado casos de inflamación y formación de abscesos en diferentes órganos y tejidos, como corazón, cerebro, hígado, bazo, esófago, tracto urinario y articulaciones. Los agentes etiológicos reportados de casos de tricosporonosis son: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin* y *T. mucoides*, siendo *T. asahii* la de mayor incidencia<sup>33,41-45</sup>.

#### 1.3.4 Tratamiento de las infecciones por *Trichosporon* spp.

El tratamiento de las infecciones superficiales causadas por *Trichosporon* spp. son tratadas con soluciones galénicas como 1% cloruro de mercurio, 1% iodo, y 30% ácido salicílico. También pueden tratarse con antifúngicos tópicos, principalmente imidazoles como econazol, isoconazol, miconazol y ketoconazol.

En pacientes con piedra blanca, se recomienda rasurar la zona con el pelo afectado previo al tratamiento tópico<sup>18,19,23</sup>.

El manejo de infecciones profundas ha representado un reto para la clínica. *Trichosporon* spp. ha mostrado resistencia variable a los antifúngicos más comunes, como polienos y equinocandinas, por lo que no existe un tratamiento óptimo en casos de tricosporonosis<sup>12</sup>; sin embargo, se han empleado ketoconazol e itraconazol con buenos resultados y existen estudios que correlacionan al voriconazol y posaconazol con una buena respuesta clínica<sup>19</sup>.

## **CAPÍTULO 2**

### **ANTECEDENTES**

#### **2.1 Identificación de *Trichosporon* spp.**

##### 2.1.1 Identificación morfológica

El diagnóstico de infecciones por *Trichosporon* spp. en laboratorios clínicos varía según se trate de infecciones superficiales o sistémicas. En el caso de piedra blanca, la muestra de pelo es sumergida en una solución de hidróxido de potasio al 10% para la observación bajo el microscopio de los nódulos formados por la agregación de las esporas alrededor de la vaina de pelo, lo que permite el diagnóstico diferencial de otras parasitaciones como pediculosis o tricomicosis. Similarmente, el diagnóstico de onicomycosis requiere que el raspado de uñas sea sumergido en hidróxido de potasio al 10% para la observación de hifas y conidias. En ambos casos, el diagnóstico etiológico preciso requiere de un cultivo.

El diagnóstico de tricosporonosis se realiza rutinariamente por la recuperación del hongo a partir de muestras de sangre y/o biopsias. Los cultivos obtenidos de diversas muestras clínicas se emplean para la identificación por morfología

confirmando la presencia de las 3 estructuras características del género: hifas hialinas septadas, artroconidias y blastoconidias<sup>19</sup>.

### 2.1.2 Identificación bioquímica

El perfil bioquímico de *Trichosporon* spp. se puede obtener por auxanografía, que evalúa la habilidad de asimilar diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, la caracterización bioquímica completa de *Trichosporon* se basa en la asimilación de aproximadamente 50 compuestos carbonados y requiere de 5 a 15 días; por consecuencia, éste método no es práctico para realizarse de manera rutinaria si se desea la identificación precisa de las especies.

Existen métodos comerciales que sistematizan la aplicación de las pruebas de asimilación y reducen el tiempo necesario para la identificación. El sistema API 20C AUX de bioMérieux es un micrométodo comercial que se ha convertido en el más empleado como método rutinario de identificación. Este sistema evalúa la asimilación de 19 carbohidratos y permite la identificación en periodo de 24 a 72 h de incubación. Sin embargo, una limitante de este método y otros disponibles comercialmente es que sólo permiten la identificación de 3 especies del género: *T. asahii*, *T. inkin* y *T. mucoides*.

### 2.1.3 Identificación molecular

Diferentes métodos moleculares se han desarrollado como alternativas rápidas y efectivas para la identificación precisa de muchos patógenos a nivel de

especie. De éstos, la secuenciación del ADN ribosomal es ampliamente usado en la identificación sistemática del microorganismo. La identificación molecular de hongos es típicamente realizada por secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS; *internal transcribed spacer*). Uno de los inconvenientes de esta región es el hecho de que es altamente homóloga entre las diferentes especies del género *Trichosporon*, por lo que el análisis de otros genes y regiones con mayor heterología han sido necesarios para una identificación más precisa de las especies.

Sugita y cols. analizaron 84 cepas correspondientes a 25 especies de *Trichosporon* para evaluar la eficiencia de la secuenciación del espaciador intergénico 1 (IGS1; *intergenic spacer 1*) versus la región ITS para la identificación precisa a nivel de especie. Ellos encontraron una mayor heterología entre las regiones IGS1 en comparación con las regiones ITS. Con este estudio quedó definido que el análisis de las secuencias IGS1 es superior a ITS para diferenciar las especies de este género. Además, este método permite al mismo tiempo la genotipificación de *T. asahii*<sup>46</sup>.

## **2.2 Factores de virulencia**

### **2.2.1 Producción de compuestos líticos**

Las toxinas y compuestos líticos se encuentran entre los factores más importantes que permiten la invasión y crecimiento de hongos patogénicos en el cuerpo humano. Las hemolisinas, proteasas y lipasas permiten la degradación

de proteínas y desestabilización de las membranas celulares, incrementando la patogenicidad del microorganismo<sup>47</sup>.

Dağ y Cerikçioğlu analizaron la producción de proteasas, fosfolipasas y esterases de 48 aislamientos clínicos de *T. asahii*. En este estudio no detectaron actividad de proteasa ni fosfolipasa en ninguno de los aislamientos analizados; sin embargo, todos los aislamientos mostraron actividad esterasa<sup>48</sup>. De manera similar, Sun y cols. evaluaron la actividad proteasa, fosfolipasa y hemolisina de 23 aislamientos clínicos de *T. asahii*, y observaron que ninguno presentó actividad de proteasa o fosfolipasa, mientras que el 100% de los aislamientos mostró la producción de hemolisina. No obstante la cantidad de hemolisina producida por cada aislamiento varió en los diferentes genotipos de *T. asahii* identificados<sup>41</sup>.

### 2.2.2 Formación de biopelículas

Otro factor que provee protección al hongo es la formación de biopelículas. Algunos microorganismos tienen la capacidad de producir una matriz extracelular formada por polisacáridos, proteínas y ADN, que permite la conglomeración de células y su adherencia a superficies orgánicas e inorgánicas. Estas biopelículas facilitan la colonización, crecimiento y proliferación de los microorganismos, y les confiere resistencia contra la actividad de antibióticos y estrés ambiental<sup>49</sup>. Debido a la relación entre las infecciones invasivas y el uso de catéteres y dispositivos similares, la habilidad de los microorganismos para adherirse y

formar biopelículas podría tener un importante papel en la patogénesis durante la tricosporonosis.

Di Bonaventura y cols. evaluaron la cinética de la formación *in vitro* de biopelículas de la cepa tipo *T. asahii* ATCC 201110. Ellos observaron que las células de *T. asahii* fueron capaces de adherirse a superficies de poliestireno a partir de los 30 minutos de incubación a 37°C, mostrando una actividad metabólica limitada durante las primeras 4 h. La complejidad de la biopelícula incrementaba después de las 6 a 8 h de incubación, periodo durante el cual fue posible observar una monocapa formada por estructuras filamentosas. A las 72 h, las células mostraron estructuras levaduriformes y filamentosas embebidas en una matriz extracelular, formando una biopelícula madura de 20 a 40 µm de espesor<sup>50</sup>. De manera similar, Dağ y Cerikçioğlu reportaron una producción débil a moderada de biopelículas en el 58% de aislamientos clínicos de *T. asahii* evaluados<sup>48</sup>. Sun y cols. reportaron producción *in vitro* de biopelículas moderada a alta exclusivamente en aislamientos clínicos de *T. asahii* pertenecientes a los genotipos III y IV<sup>41</sup>.

## **2.3 Susceptibilidad a antifúngicos**

### **2.3.1 Susceptibilidad de células planctónicas**

*Trichosporon* spp. fue reportado por primera vez como un patógeno resistente a anfotericina B por Walsh y cols. en 1990, después de evaluar 2 aislamientos de *T. beigelii* obtenidos de pacientes con infecciones sistémicas<sup>51</sup>. Desde su revisión

taxonómica, diversos estudios han evaluado la eficacia de diferentes antifúngicos contra las especies del género, principalmente *T. asahii*. Es importante mencionar que, a la fecha, no existe un método establecido para determinar la susceptibilidad *in vitro* de especies pertenecientes al género *Trichosporon*. El protocolo más ampliamente usado es una adaptación al método empleado para *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans* descrito en el documento M27-A3 y M44-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI; (Clinical and Laboratory Standards Institute), y que determina los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual es la concentración del antifúngico que inhibe el crecimiento visible del 50% o el 100% del microorganismo.

Uno de los antifúngicos más evaluados en el laboratorio ha sido la anfotericina B (AMB). Éste es un compuesto poliénico que desestabiliza la membrana plasmática fúngica. La AMB es el tratamiento por elección en las infecciones sistémicas. *T. asahii* consistentemente ha obtenido CMIs de  $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ <sup>33,52-54</sup>. Existen CMIs similares para otros aislamientos clínicos incluyendo *T. asteroides*, *T. cutaneum* y *T. ovoides*<sup>33</sup>. Rodríguez-Tudela y cols., en contraste a los estudios previos, reportaron CMIs bajas para *T. cutaneum* y *T. ovoides* ( $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ ), mientras que *T. mucoides* mostró una gran variabilidad en su susceptibilidad a AMB<sup>52</sup>. *T. inkin* también ha demostrado susceptibilidad *in vitro* a la actividad inhibitoria de AMB ( $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ )<sup>52,53</sup>.

Los compuestos triazólicos son inhibidores de la síntesis de ergosterol, el principal componente de la membrana plasmática fúngica. Además, los triazoles interactúan con enzimas a nivel mitocondrial causando la acumulación de

radicales libres dentro de la célula y provocando la inhibición del crecimiento fúngico. Los triazoles incluyen al fluconazol (FLC), voriconazol (VRC), itraconazol (ITC) y posaconazol (PSC). Estos agentes han demostrado una mejor actividad *in vitro* contra *Trichosporon* spp., con CMI's relativamente bajas para *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. inkin*, *T. cutaneum* y *T. ovoides* (FLC  $\leq 32$   $\mu\text{g/ml}$ , ITC  $\leq 1.4$   $\mu\text{g/ml}$ , PSC 0.25  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>33,52-54</sup>. El VRC es particularmente efectivo para la inhibición *in vitro*, con CMI's de  $\leq 0.28$   $\mu\text{g/ml}$  para las 6 especies de *Trichosporon* más frecuentemente aisladas en infecciones humanas<sup>52,54</sup>.

La 5-fluocitosina (5FC) es un inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos que ha demostrado una pobre actividad antifúngica contra las especies de *Trichosporon* clínicamente relevantes, con CMI's de  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  y alcanzando concentraciones de hasta 128  $\mu\text{g/ml}$  para *T. mucoides*<sup>33,41,52,54</sup>.

La caspofungina (CAS) es una equinocandina que inhibe la síntesis de la pared celular fúngica. A la fecha, se han reportado CMI's altas para *T. asahii* ( $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ ) y *T. asteroides* (16  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>54,55</sup>.

### 2.3.2 Susceptibilidad de biopelículas

Di Bonaventura y cols. reportaron un decremento en la actividad de AMB, CAS, FLC y VRC contra biopelículas preformadas de aislamientos clínicos de *T. asahii*. Las CMI's necesarias para observar inhibición *in vitro* del microorganismo eran de 2 a 9  $\log_2$  más altas para biopelículas que para células platónicas<sup>50</sup>. De manera similar, Sun y cols. reportaron un aumento en la resistencia a antifúngicos

por parte de aislamientos clínicos de *T. asahii*. Ellos demostraron que, aún y cuando los antifúngicos eran eficaces sobre células planctónicas, las biopelículas preformadas eran resistentes a los antifúngicos, aún a concentraciones de 1024 µg/ml<sup>41</sup>.

## 2.4 Patogenicidad *in vivo*

### 2.4.1 Modelos murinos de tricosporonosis

Existen algunos reportes en los que se emplean modelos murinos para la evaluación de la sobrevivencia y daño tisular durante infecciones sistémicas por *Trichosporon* spp. Estos estudios se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Resumen de estudios de sobrevivencia en modelos murinos de tricosporonosis.**

Microorganismo	Ratones	Esquema de inmunosupresión inicial / inóculo	Sobrevivencia (% de ratones / días)	Referencia
<i>T. beigellii</i>	CF1 Machos 6-8 sem	CY, -24 h 150 mg/kg $1 \times 10^6$	20% / 30 d	Gokaslan y Anaissie 1992
<i>T. beigellii</i>	CD1 Hembras	CY, -2 d 150 mg/kg $6 \times 10^6$	0% / 10 d	Hospenthal y cols. 1993
<i>T. asahii</i>	ICR Machos 8 sem	CY, -3 d 200 mg/kg $3 \times 10^6$	80% / 35 d	Yamagata y cols. 2000
<i>T. dermatis</i>	BALB/c Machos 6-8 sem	CY, -4 d 100 mg/kg $2 \times 10^6$	70% / 5 d	Lin y cols. 2011

CY: ciclofosfamida.

Estudios de supervivencia han demostrado que el establecimiento de la infección es dependiente a la dosis del inóculo. Sin embargo, tanto el tamaño del inóculo como el tiempo post-infección que permita observar invasión a tejidos varían en los diferentes reportes. Gokaslan y Anaissie determinaron que un inóculo de  $\geq 2 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC) causa 100% de mortalidad e invasión a órganos en ratones inmunosuprimidos 6 días post-infección<sup>56</sup>. Por otro lado, Hospenthal y cols. reportaron que un inóculo de  $\geq 7 \times 10^6$  UFC causaba 100% de mortalidad con invasión a tejido 6 h post-infección<sup>57</sup>. Estos modelos fueron desarrollados con *T. beigeli*, por lo que las diferencias observadas en infectividad y progreso de la enfermedad pudiera ser resultado de una infección por diferentes especies del género.

Yamagata y cols. emplearon un inóculo de  $3 \times 10^6$  UFC de *T. asahii* en un modelo murino en el que los animales fueron sujetos a diferentes esquemas de re-inmunosupresión durante la infección. Ellos observaron que los ratones que no fueron re-inmunosuprimidos o aquellos re-inmunosuprimidos al día 21 post-infección mostraban un 80% de sobrevivencia a los 35 días. Estos resultados fueron significativamente diferentes a los obtenidos con los ratones re-inmunosuprimidos los días 7 y 14 post-infección, que mostraban una sobrevivencia del 0 al 50% en el mismo periodo. En este estudio concluyeron que las primeras tres semanas son críticas para el desarrollo de tricosporonosis causada por *T. asahi*<sup>58</sup>.

Lin y cols. desarrollaron un modelo murino con *T. dermatis*, en el que observaron que una dosis de  $2 \times 10^7$  UFC/ml resultaba letal para ratones inmunosuprimidos, mientras que en ratones inmunocompetentes observaron un 100% de sobrevivencia<sup>59</sup>.

#### 2.4.2 Persistencia de estructuras fúngicas en órganos

Se ha demostrado una presencia generalizada del hongo en ciertos órganos afectados. Se ha reportado la persistencia del microorganismo en riñones de ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes. En grupos de animales en donde la mortalidad es inducida por inoculación de dosis letales, el inóculo inicial se ha recuperado hasta 36 veces más en cerebro, corazón y riñón. La resolución de la infección en animales re-inmunosuprimidos no se ha observado. La presencia de *Trichosporon* spp. ha sido confirmada por métodos moleculares, aún y cuando la cantidad de células fúngicas se encuentra por debajo del límite de detección microbiológica<sup>42,56,57</sup>. Tanto hifas como conidias se han observado en diferentes proporciones dependiendo del órgano y etapa de la infección. Estructuras levaduriformes se encuentran comúnmente en etapas tempranas, mientras que hifas y artroconidias se presentan en etapas tardías de la infección. Se ha reportado la predominancia de estructuras levaduriformes en pulmones de animales infectados<sup>57</sup>.

### 2.4.3 Daño tisular

Uno de los signos más prevalentes de tricosporonosis invasiva es la inflamación granulomatosa en pulmones, hígado, nódulos linfáticos y bazo en ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes, así como invasión fúngica del lumen o periferia de vasos sanguíneos<sup>56,57,60</sup>. Otros hallazgos incluyen hiperemia en riñón, bazo, pulmón y corazón. Se ha observado también edema tubular, destrucción focal del parénquima, necrosis tubular cortical e inflamación crónica con fibrosis en riñones de ratones que sobreviven la infección. En el hígado, se ha reportado dilatación y congestión de sinusoides hepáticos, así como degeneración y necrosis de algunos hepatocitos y proliferación de células de Kupffer. Se ha demostrado también la dilatación de sinusoides esplénicos y esplenomegalia. En pulmones, se ha descrito edema, hemorragia y ectasia alveolar. En corazón, se ha reportado hemorragia y necrosis de cardiomiocitos<sup>56,57,59,60</sup>.

## 2.5 Respuesta inmune del hospedero

La neutropenia es la principal condición asociada al desarrollo de tricosporonosis; sin embargo, en los últimos años se ha investigado el papel de algunas citocinas durante la infección por *Trichosporon* spp. El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una de las citocinas estudiadas debido a su papel hematopoyético favoreciendo el incremento del número de células polimorfonucleares, así como el factor estimulante de colonias de granulocitos-

macrófagos (GM-CSF) involucrado también en la hematopoyesis, generando y activando funciones de los monocitos-macrófagos<sup>61</sup>.

Muranaka y cols. realizaron un modelo de tricosporonosis diseminada con *T. asahii* empleando ratones ddY inmunosuprimidos para la evaluación de G-CSF y GM-CSF como terapia contra la infección sistémica. Ellos observaron que el uso de G-CSF previo a la infección incrementaba la sobrevivencia de los ratones del 25% al 100%, disminuyendo la carga fúngica y daño tisular en órganos afectados, con una mejora notable en pulmón. El incremento de neutrófilos por tratamiento con GM-CSF fue menor que el generado por G-CSF, por lo que la terapia con GM-CSF no generó mejoría en los animales. En el mismo estudio, se observó un incremento de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en fluido de lavado broncoalveolar en ratones infectados con dosis letales de *T. asahii* y tratados con GM-CSF comparado con animales no inmunosuprimidos o animales tratados con G-CSF. Además, se observó una correlación negativa entre la producción de TNF- $\alpha$  y la presencia de leucocitos en sangre periférica, disminuyendo la producción de esta citocina a medida que los ratones se recuperaban de la neutropenia. Por otro lado, el empleo de una terapia anti-TNF- $\alpha$  no favoreció la resolución de la infección. A pesar de emplear dosis suficientes para la inhibición total de esta citocina, se observaron altos niveles de TNF- $\alpha$  en pulmón y una mortalidad del 100% al día 6 post-infección. Los autores propusieron que la cuenta de neutrófilos fue el factor más crítico en el desarrollo de tricosporonosis; sin embargo, otros factores, como TNF- $\alpha$  en pulmón, tuvieron un papel importante en la prognosis de la infección<sup>62</sup>.

El uso de M-CSF también ha sido evaluado como activador de la fagocitosis en un modelo murino de tricosporonosis con *T. asahii*. M-CSF incrementó la actividad fungicida en células mononucleares, con un notable incremento en la sobrevivencia de los ratones y un decremento en la carga fúngica. Además, el incremento de TNF- $\alpha$  en pulmones y plasma en animales tratados con M-CSF fue significativamente mayor que el detectado en controles. En contraste a los resultados reportados por Muranaka y cols., el tratamiento anti-TNF- $\alpha$  se asoció a una mayor sobrevivencia de los ratones infectados. Se ha sugerido que aún y cuando TNF- $\alpha$  potencia los mecanismos de defensa contra microorganismos, la sobreproducción de esta citocina en fases agudas de la infección puede exacerbar la patogenicidad. Los resultados muestran como M-CSF incrementó exponencialmente la actividad fungicida de fagocitos mononucleares, ayudados en parte por la producción de TNF- $\alpha$ <sup>63</sup>.

Resultados similares en relación al efecto de G-CSF, GM-CSF y M-CSF sobre la capacidad fungicida de leucocitos y su papel durante la resolución de la tricosporonosis han sido reportados por Lyman y cols<sup>64</sup>.

## CAPÍTULO 3

### JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la tricosporonosis es una micosis emergente con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. En base a hallazgos moleculares, se demostró que *Trichosporon* es un género complejo formado por especies con características morfológicas y fisiológicas semejantes, por lo que es indispensable llegar a una identificación precisa de sus especies.

Actualmente, existe escasa información acerca de la producción *in vitro* de enzimas líticas y biopelículas en *Trichosporon* spp. Sin embargo, dichos ensayos *in vitro* sugieren diferencias en la virulencia de microorganismos pertenecientes a este género.

Analizar la carga fúngica, daño tisular, así como la producción de citocinas en un modelo murino de tricosporonosis, brindará nuevo conocimiento referente a la patogenicidad de la infección diseminada por estos microorganismos.

## **CAPÍTULO 4**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **4.1 Hipótesis**

Existe una correlación fenotípica y molecular con la virulencia de diferentes aislamientos clínicos de *Trichosporon*.

#### **4.2 Objetivos**

##### 4.2.1 Objetivo general

Determinar la correlación entre la identificación fenotípica y molecular y la virulencia de diversos aislamientos clínicos de *Trichosporon*.

##### 4.2.2 Objetivos específicos

1. Identificar aislamientos clínicos del género *Trichosporon* por métodos fenotípicos y moleculares.
2. Determinar algunos factores de virulencia de los aislamientos clínicos del género *Trichosporon*.

3. Determinar la virulencia de las diferentes especies empleando un modelo murino de tricosporonosis.
4. Correlacionar la caracterización fenotípica y molecular con la virulencia de las diferentes especies de *Trichosporon*.

## **CAPÍTULO 5**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **5.1 Aislamientos de *Trichosporon* spp.**

Se emplearon 82 aislamientos clínicos obtenidos de diferentes pacientes entre 2003 y 2014 por el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UANL. Las cepas fueron reactivadas en agar papa dextrosa (APD) a 30°C por 7 d. Las células fueron transferidas a viales con agua bidestilada estéril y almacenadas a temperatura ambiente hasta su uso. Previo a los experimentos, los aislamientos fueron subcultivados en agar Sabouraud glucosado (ASG) por 24 h a 30°C.

#### **5.2 Identificación de aislamientos**

##### **5.2.1 Morfología**

Los aislamientos fueron re-suspendidos en solución salina (SS; NaCl 0.85%) y 10 µl de la suspensión fueron inoculados por goteo en ASG e incubadas a 30°C por 10 d. Se realizaron observaciones macro- y microscópicas en las colonias obtenidas<sup>65</sup>.

### 5.2.2 Prueba de la ureasa

La actividad ureasa se realizó por inoculación directa de cada cepa en agar urea de Christensen (0.1% p/v bacto peptona, 0.5% p/v glucosa, 0.5% p/v NaCl, 0.2% p/v KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.0012% p/v rojo fenol, 1.5% p/v agar y 40% v/v urea), e incubando por 24 h a 37°C. La prueba se determinó como positiva al observar un cambio de color total del medio de amarillo a rosa fuerte<sup>66</sup>.

### 5.2.3 Asimilación de carbohidratos

La identificación del perfil de asimilación de carbohidratos de las cepas se realizó con el sistema API 20C AUX (bioMérieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante<sup>67</sup>. Se agregaron 5 ml de agua destilada en los alvéolos de la cámara de incubación. Las galerías conteniendo las cúpulas con los carbohidratos sustrato fueron colocadas en estas cámaras. Se suspendieron células de un cultivo joven de 24 h en 2 ml de SS. Esta suspensión se ajustó hasta igualar la turbidez del tubo 2 de McFarland. Inmediatamente, se transfirieron 100 µl de esta suspensión a una ampolleta de API C medium, proporcionado por el fabricante, y se homogenizó con la pipeta evitando la formación de burbujas. Se llenaron las cúpulas de la galería con la suspensión obtenida en el API C medium, colocando la punta de la pipeta sobre la zona lateral de la cúpula para evitar la formación de burbujas o salpicaduras. Se llenaron las cúpulas hasta crear un nivel ligeramente convexo sobre la superficie. La cámara de incubación fue posteriormente colocada por 72 h a 30°C. Cada 24 h posterior a la inoculación de la galería, se observó el crecimiento de las

levaduras comparativamente con la cúpula 0, correspondiente al control negativo. Una cúpula con mayor turbidez que la del control se registró como una reacción positiva de asimilación. La identificación se realizó a partir del perfil numérico en la base de datos del API.

#### 5.2.4 Identificación molecular y genotipificación

##### 5.2.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó por lisis enzimática siguiendo modificaciones del método Sambrook y Russell<sup>68</sup>. Aproximadamente 100 mg de las levaduras se re-suspendieron en 200 µl de solución de lisis enzimática (0.4mM Tris-HCl pH=8.0, 0.008 mM EDTA, 0.015% Tritón X-100) con 20 mg/ml de lizosima en un tubo Eppendorf de 2 ml y se mezcló a 37°C y 800 rpm por 2 h. Posteriormente, se agregaron 390 µl de TE 1× (10 mM Tris-HCl pH=8.0, 1 mM EDTA) y 1% SDS a una relación 1:1, además de 4 µl de proteasa K y 10 µl de quitinasa. Esta mezcla se incubó a 55°C por 1 h. Se adicionaron 100 µl de 5 M NaCl y 80 µl de CTAB (10% CTAB, 0.7% NaCl), se mezcló por inversión y se incubó a 65°C por 10 min. Después, se agregaron 250 µl de SEVAGE, 250 µl de fenol saturado y 100 µl de TE 1×, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 8 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf de 2 ml limpio y se agregó nuevamente SEVAGE, fenol saturado y TE 1×, seguido de una centrifugación. Posteriormente, se agregaron 600 µl de isopropanol y 160 µl de 3 M acetato de sodio pH=5.2±2 y se incubó a -20°C por un mínimo de 30 min. Después de este tiempo de incubación, se centrifugó la mezcla a 14000 rpm por

8 min y se decantó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de 70% etanol, se centrifugó a 14000 rpm por 8 min y se decantó el sobrenadante. La pastilla resultante se dejó secar a temperatura ambiente por una noche. Posteriormente, se re-suspendió la pastilla en volúmenes variables de agua miliQ estéril y se incubó a 65°C por 15 min. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### 5.2.4.2 Amplificación de las regiones IGS1 e ITS1-5.8S-ITS2

La amplificación de las regiones ribosomales IGS1 e ITS1-5.8S-ITS2 se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Los ácidos nucleicos extraídos de los aislamientos fueron empleados como ADN blanco. Las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes de 50 µl usando Taq polymerase Master Mix (Promega, Madison, WI) como buffer de reacción. Las mezclas de reacción se prepararon con 5 pmol/µl de cada uno de los iniciadores y aproximadamente 150 ng/µl de ADN blanco. Los iniciadores empleados se especifican en la Tabla 3.

**Tabla 3. Iniciadores empleados para la amplificación de las regiones IGS1 e ITS1-5.8S-ITS2.**

Región	Iniciador	Secuencia	Referencia
IGS1	26SF	5'-ATCCTTTGCAGACGACTTGA-3'	Sugita y cols. (2002) <sup>46</sup>
	5SR	5'-AGCTTGACTTCGCAGATCGG-3'	
ITS1-5.8S-ITS2	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Richini-Pereira y cols. (2012) <sup>69</sup>
	ITS5	5'-GGAGTAAAAGTCGTAACAACG-3'	

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad) bajo las condiciones descritas en la Tabla 4.

**Tabla 4. Condiciones empleadas para las reacciones de amplificación de las regiones IGS1 e ITS1-5.8S-ITS2.**

Etapa	IGS1			ITS1-5.8S-ITS2		
	No. de ciclos	Temp. (°C)	Tiempo	No. de ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
Inicio	1	94	3 min	1	95	4 min
Desnaturalización	35	94	30 s	30	94	1 min
Alineamiento		57	30 s		55	90 s
Elongación		72	1 min		72	90 s
Elongación final	1	72	10 min	1	72	5 min
Conservación	1	4	∞	1	4	∞

#### 5.2.4.3 Electroforesis de ADN

La electroforesis de ADN se realizó en geles de agarosa al 0.8% (p/v) para el ADN genómico y al 1.2% (p/v) para los productos de PCR. Los geles fueron preparados en solución amortiguadora 1× TBE (8.9 mM Tris, 8.9 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH=8.0) y adicionados con 0.01% (v/v) de 10 mg/ml bromuro de etidio. La electroforesis se corrió en la misma solución amortiguadora a 80mV por 1 h. En el caso de los productos de PCR, las muestras se corrieron acompañadas de marcadores de tamaño molecular de 100 a 1000 pb.

#### 5.2.4.4 Estimación del tamaño de fragmentos de ADN

Los tamaños de fragmentos del ADN se midieron comparando la distancia de migración de los fragmentos de interés y la de un marcador de tamaño conocido posterior a la electroforesis en gel de agarosa. Los tamaños fueron calculados empleando el paquete GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com>).

#### 5.2.4.5 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados empleando el kit comercial ExoSAP-IT (Affymetrix USB, Santa Clara, CA). Posterior a la amplificación, 2 partes de ExoSAP-It fueron mezclados con 5 partes de producto de PCR y esta mezcla fue incubada a 37°C por 15 min. Después, la mezcla se incubó a 80°C por 15 min para inactivar al reactivo.

#### 5.2.4.6 Secuenciación

Los productos de PCR fueron secuenciados por el método Sanger en un Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, en San Luis Potosí, SLP.

#### 5.2.4.7 Identificación y genotipificación

La identificación se realizó por comparación de las secuencias de nuestros aislamientos con secuencias de cepas tipo previamente reportadas en la base de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las secuencias y sus números de acceso se enlistan en la Tabla 5. El alineamiento de secuencias se realizó en GeneStudio Professional software versión 2.2.0.0 (<http://www.genestudio.com>). Se consideró como identificación positiva a aquellas secuencias con un 100% de cobertura y  $\geq 98\%$  de homología con la cepa tipo. Para la genotipificación, se consideraron como positivas aquellas secuencias con un 100% de cobertura y un 100% de homología.

**Tabla 5. Cepas tipo de *Trichosporon* sp. empleadas para la alineación e identificación de los aislamientos clínicos.**

Especie	Cepa tipo	No. de acceso GenBank
<i>T. asahii</i> Genotipo I	CBS 2479	AB066386
<i>T. asahii</i> Genotipo II	M 9475	AB072606
<i>T. asahii</i> Genotipo III	CBS 2530	AB066397
<i>T. asahii</i> Genotipo IV	M 9474	AB066399
<i>T. asahii</i> Genotipo V	M 9410	AB066401
<i>T. asahii</i> Genotipo VI	M 9987	AB180192
<i>T. asahii</i> Genotipo VII	M 9988	AB180193
<i>T. asahii</i> Genotipo VIII	G 07	AB439002
<i>T. asahii</i> Genotipo IX	A 02	AB439003
<i>T. asahii</i> Genotipo X	BZP07004	EU441158
<i>T. asahii</i> Genotipo XI	BZP07001	EU441160
<i>T. asahii</i> Genotipo XII	BZP09001	JF412789
<i>T. asteroides</i>	CBS 2481	AB066405
<i>T. coremiiforme</i>	CBS 2483	AB066406
<i>T. debeurumanianum</i>	CBS 1896	AB066411
<i>T. dermatis</i>	CBS 2043	AB066412
<i>T. faecale</i>	CBS 4828	AB066413
<i>T. brassicae</i>	CBS 6382	AB066414
<i>T. cutaneum</i>	CBS 2466	AB066415
<i>T. domesticum</i>	M 9401	AB066416
<i>T. dulcitum</i>	CBS 8257	AB066419
<i>T. gracile</i>	CBS 8189	AB066421
<i>T. guehoae</i>	CBS 8521	AB066423
<i>T. inkin</i>	CBS 5585	AB066424
<i>T. japonicum</i>	JCM 8357	AB066426
<i>T. jirovecii</i>	CBS 6864	AB066427
<i>T. loubieri</i>	CBS 7065	AB066428
<i>T. moniliiforme</i>	CBS 2467	AB066429
<i>T. montevideense</i>	CBS 6721	AB066431
<i>T. mucoides</i>	CBS 7625	AB066433
<i>T. ovoides</i>	CBS 7556	AB066434
<i>T. porosum</i>	CBS 2040	AB066435
<i>T. sporotrichoides</i>	CBS 8246	AB066438
<i>T. veenhuisii</i>	CBS 7136	AB066439

### 5.3 Determinación de factores de virulencia

#### 5.3.1 Compuestos líticos

##### 5.3.1.1 Gelatinasa

Para esta prueba se empleó un medio con 12.8% (p/v) de gelatina nutritiva en agua desionizada. La gelatina fue hidratada en agua por 15 min y posteriormente

el medio se calentó a 50°C hasta fundir la gelatina. Se dispensaron 5 ml del medio en tubos de ensaye 13 x 100, se esterilizaron y se permitió que el medio solidificara nuevamente a 4°C por 24 h. Los aislamientos se inocularon directamente por punción en el medio de agar gelatina y se incubaron a 30°C por 3 sem. Después, los tubos fueron nuevamente incubados a 4°C por 2 h. Se empleó *Pseudallescheria boydii* como control positivo. La actividad de gelatinasa se determinó como positiva al observar la licuefacción total del medio de cultivo<sup>70</sup>.

#### 5.3.1.2 ADNasa

Los aislamientos fueron directamente inoculados por estría en medio agar ADNasa con verde metilo (*DNase test agar with methyl Green medium*; Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia) e incubados por 7 d a 37°C. Se empleó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control positivo.

#### 5.3.1.3 Hemolisina, fosfolipasa, aspartil-proteasa y esterasa

Las células de nuestros aislamientos fueron re-suspendidas en agua desionizada estéril a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml y 5  $\mu$ l de esta suspensión fueron inoculados por goteo en el medio apropiado. Para la evaluación de la actividad hemolítica se empleó el agar Sabouraud glucosado enriquecido con sangre (65 g/l ASG, 3% p/v glucosa, 7% v/v sangre)<sup>71</sup>. La actividad fosfolipasa se evaluó en agar yema de huevo (65 g/l ASG, 3% p/v glucosa, 1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 8% v/v emulsión de yema de huevo)<sup>72</sup>. La actividad aspartil-proteasa se analizó en agar albúmina de suero bovino (ASB) (1.17% p/v base carbón para levaduras, 0.01% p/v extracto de levadura, 0.2%

p/v ASB, 1.12% agar)<sup>73</sup>. La actividad esterasa se evaluó en agar Tween 80 (1% p/v bacto peptona, 0.5% p/v NaCl, 0.01% p/v CaCl<sub>2</sub>, 5% p/v agar, 0.5% v/v Tween 80)<sup>74</sup>. Las placas fueron incubadas a 37°C por 2, 5, 7 y 10 d, respectivamente. *C. albicans* ATCC 90028 se usó como control positivo. Agua desionizada estéril se empleó como control negativo en todos los ensayos enzimáticos.

La actividad hemolítica se determinó como positiva al observar la presencia de un halo translúcido alrededor del sitio de inoculación, visible con luz transmitida. Las actividades fosfolipasa y aspartil-proteasa se determinaron como positivas por la formación de un halo de precipitación alrededor del crecimiento de la colonia. La positividad de la actividad esterasa se estableció por la presencia de cristales opacos alrededor de la colonia, visibles con luz transmitida.

La actividad enzimática fue expresada como un valor Pz, que determina la razón del diámetro de la colonia contra el diámetro del halo de actividad. Así, la actividad fue categorizada como “muy fuerte” ( $Pz \leq 0.69$ ), “fuerte” ( $Pz = 0.70-0.79$ ), “intermedia” ( $Pz = 0.80-0.89$ ), “débil” ( $Pz = 0.90-0.99$ ) y “negativa” ( $Pz = 1.0$ )<sup>75</sup>.

### 5.3.2 Biopelículas

#### 5.3.2.1 Producción de biopelículas

La producción de biopelículas se realizó con modificaciones al método de Di Bonaventura<sup>50</sup>. Aislamientos subcultivados en ASG fueron transferidos a caldo de extracto de levadura (YEPD; 1% p/v extracto de levadura, 2% p/v peptona, 2%

p/v glucosa) e incubados por 18 h a 30°C y 150 rpm. Las células fueron colectadas por centrifugación a 3500 rpm, lavadas dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril, y re-suspendidas en RPMI 1640 con L-glutamina ajustado a pH 7.0 con 0.165 ácido morfolinopropanesulfónico (RPMI 1640-MOPS; Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA). El inóculo fue ajustado a  $1 \times 10^7$  ufc/ml por espectrofotometría a 590 nm y 100  $\mu$ l fueron transferidos a placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano pre-esterilizadas (Corning Incorporated, Corning, NY). Las placas fueron incubadas por 1, 2, 4, 6 y 8 h a 37°C. Posterior a la incubación, el medio fue decantado y los pocillos se lavaron 2 veces con 150  $\mu$ l de PBS para remover las células no adheridas. Los pocillos fueron rellenos con 100  $\mu$ l de RPMI 1640-MOPS y las placas fueron incubadas a 37°C por 72 h, substituyendo el medio cada 24 h. Posterior a las 72 h, las placas fueron lavadas 2 veces con PBS.

#### 5.3.2.2 Cuantificación de biopelículas

La cuantificación de biopelículas se realizó con modificaciones al método de Melo<sup>76</sup>. Después del lavado con PBS, los pocillos se dejaron secar por 1 h a 37°C y fueron teñidos con 110  $\mu$ l de una solución acuosa al 0.4% de cristal violeta (CV). Las placas se incubaron por 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución de CV fue decantada y los pocillos fueron lavados 3 veces con 200  $\mu$ l de agua destilada estéril. Para disolver el colorante, se agregaron 200  $\mu$ l de 95% etanol a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente por 45 min. Finalmente, se transfirieron 100  $\mu$ l de la solución de cada pocillo a una placa limpia y

cuantificados por espectrofotometría a 595 nm. Los experimentos se realizaron por duplicado. *Candida albicans* ATCC 90028 se usó como control positivo.

## 5.4 Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos

### 5.4.1 Pruebas de susceptibilidad para células planctónicas

Las pruebas de susceptibilidad para células planctónicas se realizaron siguiendo el método de microdilución M27-A3 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI; *Clinical and Laboratory Standards Institute*)<sup>77</sup>.

Células provenientes de un subcultivo en ASG fueron transferidas a un tubo con 5 ml de SS. Esta suspensión se ajustó por espectrofotometría a  $T_{590nm}=77\%$  y posteriormente se diluyó 1:100 en RPMI 1640-MOPS seguida de una segunda dilución 1:20. Los pocillos de las placas de poliestireno de fondo redondo pre-esterilizadas (Corning Incorporated, Corning, NY) fueron inoculados con esta suspensión para una concentración final de  $0.5$  a  $2.5 \times 10^3$  UFC/ml en cada pocillo. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  for 48 h.

Se prepararon soluciones stock de anfotericina B (AMB; Apothecan, Princeton, NJ), anidulafungina (ANI; Ben Venue, Northfield Road Bedford, OH), micafungina (MIC; Astellas Pharma, Inc., Tokyo), caspofungina (CAS; Merck, Rahway, NJ), voriconazol (VRC; Pfizer, Inc., Mexico), posaconazol (PSC; Merck, Rahway, NJ), fluconazole (FLC; Pfizer, Inc., Amboise, Francia) y 5-flucitosina (5FC; Sigma Chemical, St. Louis, MO) diluidas con RPMI 1640-MOPS. Las

concentraciones finales empleadas de los antifúngicos fueron: 0.03 a 16 µg/ml para anfotericina B, voriconazol y posaconazol; 0.015 a 8 µg/ml para las equinocandinas y 0.125 a 64 µg/ml para fluconazol y 5-flucitosina. *Candida krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 fueron empleadas como cepas de control de calidad.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron determinadas según las guías del CLSI. Las lecturas se realizaron después de 24 h para anfotericina B y después de 48 h para el resto de los compuestos antifúngicos. La CMI para anfotericina B se tomó del pocillo con la menor concentración del antifúngico que mostraba un 100% de inhibición del crecimiento visual en comparación con el crecimiento en el pocillo control. Las CMI para el resto de los compuestos se tomaron de los pocillos con aproximadamente ≥50% inhibición del crecimiento en comparación con el crecimiento en el pocillo control. Debido a que no existen puntos de corte para *Trichosporon* spp., se emplearon los puntos de corte para *C. albicans* sugeridos por el CLSI<sup>77,78</sup>.

#### 5.4.2 Pruebas de susceptibilidad para biopelículas

Las pruebas de susceptibilidad para células embebidas en biopelícula se realizaron usando el método colorimétrico de (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido (XTT).

Se prepararon placas con biopelículas siguiendo el método descrito previamente (sección 5.3.2.1). Después de una fase de adhesión de 4 h, las

biopelículas fueron lavadas 2 veces con 150  $\mu$ l de PBS y retadas con los agentes antifúngicos por 48 h a 37°C. Para estas pruebas se emplearon AMB a concentraciones finales de 0.5 a 16  $\mu$ g/ml y FLC a concentraciones finales de 16 a 512  $\mu$ g/ml preparados en RPMI 1640-MOPS.

Se preparó XTT (Sigma, St. Louis, MO) en RPMI 1640-MOPS a una concentración de 0.5 mg/ml con 0.4 mM menadiona. Posterior a las 48 h de incubación de las placas, 100  $\mu$ l de la solución XTT-menadiona se agregaron a cada pocillo. Las placas se incubaron en la oscuridad a 37°C por 2 h. Finalmente, las células viables se cuantificaron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 490 nm. Se incluyeron pocillos sin agentes antifúngicos como controles negativos. La CMI para AMB se determinó por un decremento  $\geq$ 90% de la actividad metabólica en relación al control negativo. La CMI para FLC se determinó por un decremento  $\geq$ 50% de la actividad metabólica en relación al control negativo. Los experimentos se realizaron dos veces.

## **5.5 Modelo murino de tricosporonosis**

### **5.5.1 Animales**

Para el modelo de infección sistémica se emplearon 78 ratones BALB/c de 4 semanas de edad y 20 a 22 g de peso (Harlan México). Se mantuvieron 6 ratones por caja con ciclos de 12 h de luz/oscuridad y se les proporcionó lecho, alimento y agua estériles *ad libitum*. El cuidado, mantenimiento y uso de los animales se realizó siguiendo la norma oficial mexicana<sup>79</sup> y las guías para el cuidado y uso de

animales de laboratorio<sup>80</sup>. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario con el número de registro MB13-004.

#### 5.5.2 Preparación de inóculos

Después de determinar la pureza y viabilidad de los aislamientos en base al subcultivo en ASG, se transfirieron las células de las cepas *T. asahii* 07-230, 09-206 y 09-928 a medio YEPD y se incubaron a 37°C y 200 rpm por 24 h. Las células resultantes fueron recuperadas por centrifugación a 3500 rpm por 10 min, lavadas 2 veces con PBS y re-suspendidas en SS. Se contaron el número de blastoconidias y artroconidias en un hemocitómetro y ésta suspensión se diluyó a una concentración final de  $5 \times 10^6$  UFC/ml. La cuenta de UFC fue verificada por diluciones seriadas 1:10 y la posterior siembra de estas diluciones en placas APD, incubadas a 30°C por 24 h para su posterior recuento.

#### 5.5.3 Modelo de infección sistémica

Las cepas 07-230, 09-206 y 09-028 se ajustaron a  $5 \times 10^6$  UFC/ml y 0.2 ml de esta suspensión se inocularon en la vena lateral caudal de 3 grupos con 24 ratones cada uno. Se seleccionaron 8 ratones al azar de cada grupo experimental en los días 1, 3 y 7 post-infección. Se obtuvieron muestras de sangre de cada ratón por punción cardíaca, después de lo cual los ratones se sacrificaron por

dislocación cervical. Posteriormente, se realizaron necropsias y los riñones, bazos e hígados de cada animal fueron extraídos bajo condiciones asépticas.

#### 5.5.4 Análisis de carga fúngica tisular

Inmediatamente posterior a la necropsia, muestras de los órganos fueron pesadas, transferidas a 2 ml de SS en tubos de 15 × 100 y homogenizadas mecánicamente empleando una cuchilla Polytron-Aggregate (Kinematica). Los homogenizados se diluyeron en serie a 1:10. Alícuotas de los homogenizados diluidos y sin diluir fueron sembrados en placas APD e incubados a 30°C por 48 h. Finalmente, se contaron las colonias y se calculó el número de UFC por gramo de cada órgano.

#### 5.5.5 Histopatología

##### 5.5.5.1 Procesamiento de tejidos e inclusión en bloques de parafina

Inmediatamente posterior a la necropsia, los órganos removidos se fijaron con 10% formalina por un periodo de entre 16 y 24 h. Posterior a la fijación, los órganos fueron procesados siguiendo el esquema de la Tabla 6.

**Tabla 6. Procesamiento de tejidos.**

Etapa	Alcohol	Tiempo
Deshidratación	70% etanol	12 h
	70% etanol	12 h
	95% etanol	1 h
	95% etanol	1 h
	Etanol absoluto	2 h
Aclaramiento	Etanol absoluto:xileno absoluto (1:1)	1 h
	Xileno absoluto	1 h

Después del aclaramiento, los órganos se lavaron 2 veces en parafina a 56°C durante 1 h y fueron posteriormente embebidos en parafina formando bloques.

#### 5.5.5.2 Obtención de cortes histológicos

Los bloques se procesaron en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL. Se obtuvieron cortes histológicos de 5 µm de grosor montados sobre laminillas. Estos cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina y con plata de metenamina Grocott-Gomori.

### **5.6 Cuantificación de citocinas en suero**

#### 5.6.1 Procesamiento de muestras de sangre

Inmediatamente después de la punción cardíaca, la sangre se almacenó a 4°C hasta su procesamiento. El suero se obtuvo por centrifugación de la sangre en tubos Microtainer SST (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a 3000 rpm y 4°C por 5 min, se transfirió a crio-viales limpios y se almacenó a -80°C hasta su uso.

#### 5.6.2 Cuantificación de IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10

La cuantificación de interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A e IL-10), interferón gamma (IFN-γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) se realizó con el BD Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se mezclaron 50 µl de muestra, 50 µl de la mezcla de perlas de captura (las cuales contenían 7 diferentes poblaciones de perlas con diferente fluorescencia cubiertas con los anticuerpos específicos para cada citocina) y 50 µl de reactivo de detección (anticuerpos de detección conjugados con ficoeritrina [PE]) en tubos de poliestireno de fondo curvo (BD Falcon). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad por 2 h. Después, se agregó 1 ml de solución amortiguadora de lavado a cada tubo y éstos se centrifugaron a 200 *g* por 5 min. Los tubos se decantaron para la eliminación del sobrenadante se agregaron 300 µl de solución amortiguadora de lavado para re-suspender la pastilla.

Posteriormente, al menos 10,000 eventos de cada muestra fueron adquiridos en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences). El análisis se realizó empleando la plataforma FCAP Array TM 3.0 (BD Biosciences). Se realizaron curvas de calibración para cada una de las citocinas evaluadas empleando estándares proporcionados por el fabricante.

### 5.6.3 Cuantificación de G-CSF

La cuantificación del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) se realizó por el método de ELISA sándwich con el kit comercial Murine G-CSF Standard ABTS ELISA Development Kit (PeproTech, Rocky Hill, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Placas de poliestireno de fondo plano se incubaron con 100µl por pocillo de una suspensión de anticuerpo de captura (0.5 µg/ml anti-G-CSF murino de ratón

y 0.025 mg de D-manitol). Las placas se sellaron e incubaron a temperatura ambiente por 18 h. Posteriormente, los pocillos se lavaron 4 veces con 300 µl de solución amortiguadora de lavado (0.05% Tween-20 en PBS). Se agregaron 300 µl de solución amortiguadora de bloqueo (1% BSA en PBS) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente por 1 h. Nuevamente, las placas se lavaron 4 veces con solución amortiguadora de lavado. Inmediatamente, se agregaron 100 µl de muestra a los pocillos y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Los pocillos se lavaron 4 veces con solución amortiguadora de lavado, se agregaron 100 µl de anticuerpo de detección (0.25 µg/ml anti-G-CSSF murino de ratón biotinilado y 0.025 mg de D-manitol) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Se lavaron las placas 4 veces con solución amortiguadora de lavado, se agregaron 100 µl del conjugado avidina-peroxidasa y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Por último, se lavaron las placas 4 veces con solución amortiguadora de lavado, se agregaron 100 µl de la solución substrato ABTS y se incubó a temperatura ambiente hasta observar un cambio de color.

Las placas se leyeron durante 1h en intervalos de 5 min en un iMark™ microplate absorbance reader (BioRad) a 405 nm. Se realizaron curvas de calibración para G-CSF empleando estándares proporcionados por el fabricante.

## **5.7 Análisis estadístico**

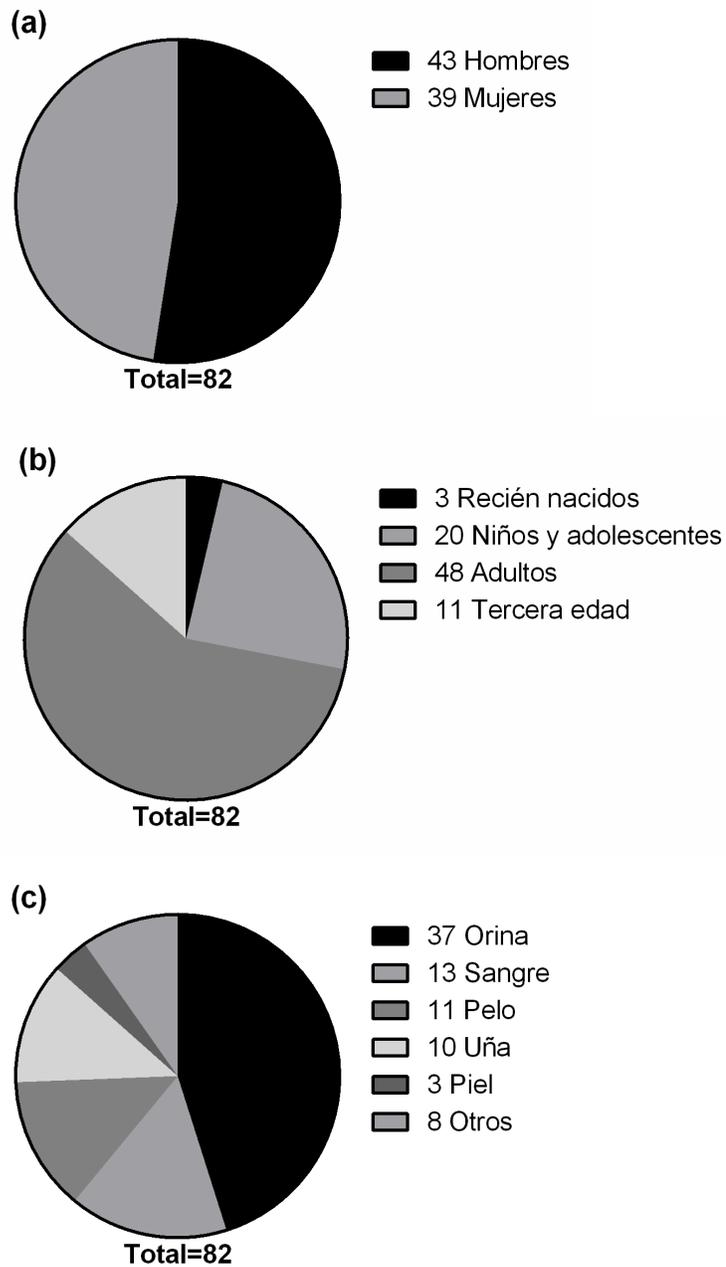
Todos los análisis estadísticos pertinentes se realizaron en el paquete GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

## CAPÍTULO 6

### RESULTADOS

#### 6.1 Información demográfica de aislamientos de *Trichosporon* spp.

Se obtuvieron un total de 82 aislamientos correspondientes a *Trichosporon* spp. del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, UANL. La Figura 2 muestra la información demográfica de los aislamientos. Los aislamientos fueron obtenidos de hombres (52.44%) y de mujeres (47.56%). Más de la mitad de los pacientes fueron adultos (19-65 años; 58.54%), seguidos de niños y adolescentes (2-18 años; 24.39%), personas de la tercera edad ( $\geq 66$  años; 13.41%) y por último recién nacidos ( $\leq 1$  años; 3.66%). El origen clínico de las muestras fue orina (45.12%), seguido de sangre (15.85%), pelo (13.41%), uñas (12.20%), piel (3.66%) y otros (9.76%).

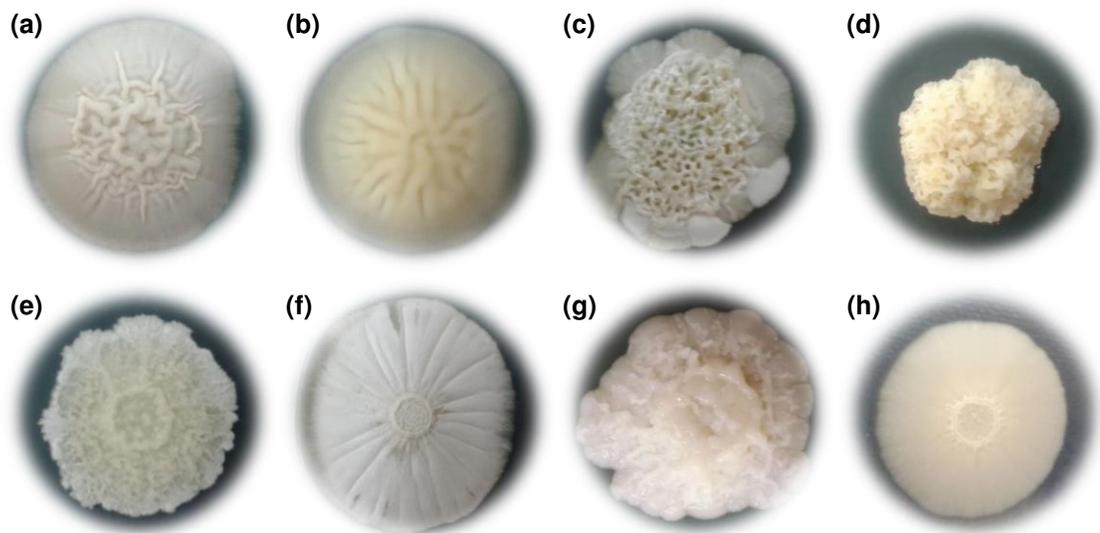


**Figura 2. Información demográfica de los aislamientos de *Trichosporon* sp.** (a) Género de los pacientes. (b) Edad de los pacientes. (c) Origen clínico de los aislamientos.

## 6.2 Identificación fenotípica y molecular

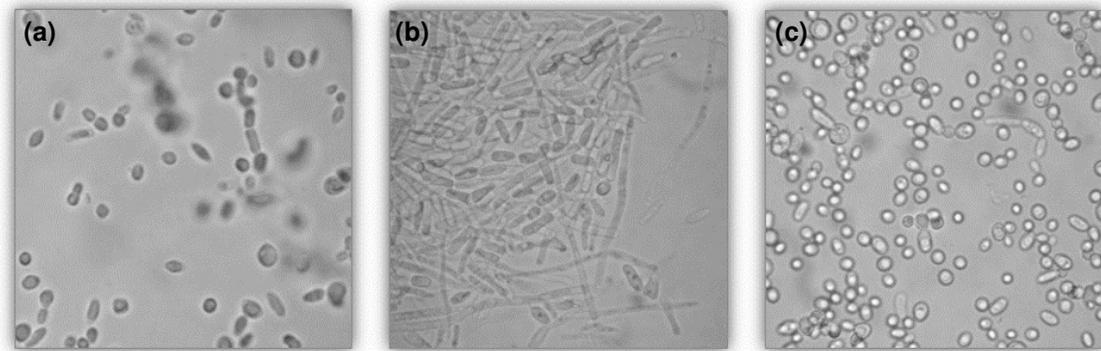
### 6.2.1 Morfología

Se analizaron las características macro- y microscópicas de los diversos aislamientos de *Trichosporon*. Macroscópicamente, se evaluaron el color, textura, topografía y borde de las colonias. La Figura 3 muestra imágenes representativas de las morfologías coloniales encontradas. Se observaron colonias con color de blanco a crema o amarillo claro, de bordes lisos a lobulados. Las colonias presentaron diversas texturas, como húmeda, seca, serosa y farinosa. La topografía de algunos de los aislamientos fue rugosa o cerebriforme y lisa.



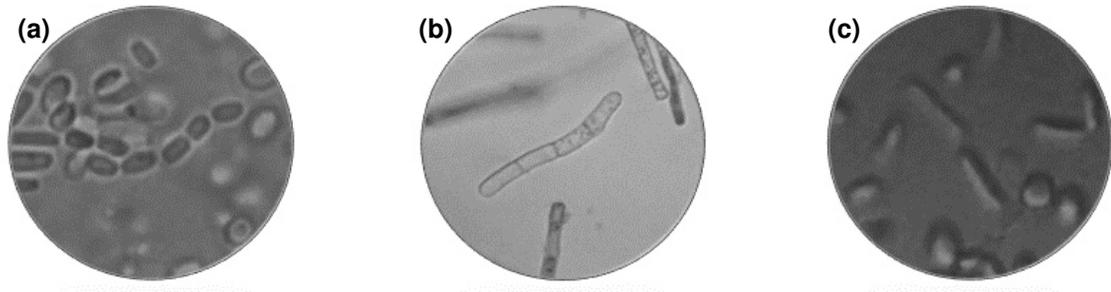
**Figura 3. Morfologías coloniales representativas de los aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp.** Colonia (a) blanca cerebriforme seca, (b) amarilla cerebriforme serosa, (c) blanca o crema rugosa seca, (d) amarilla rugosa seca, (e) blanca rugosa húmeda, (f) blanca farinosa, (g) crema cerebriforme húmeda y (h) crema lisa húmeda.

Microscópicamente se evidenció la presencia de las tres estructuras características del género *Trichosporon*: blastoconidias, artroconidias e hifas hialinas tabicadas. La proporción de cada una de estas tres estructuras, sin embargo, difirió entre los aislamientos, como se muestra en la Figura 4. Algunos aislamientos mostraron una igual proporción de blastoconidias y artroconidias (81.82%), mientras en otros se observó una mayor cantidad de artroconidias y fragmentos hifales (13.64%). Pocos aislamientos fueron altamente levaduriformes, con conidias grandes y redondas, caracterizándose además por la presencia de pseudohifas (4.54%).



**Figura 4. Morfologías microscópicas representativas de los diversos aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp.** (a) Blastoconidias y artroconidias. (b) Artroconidias y fragmentos hifales. (c) Conidias y pseudohifas.

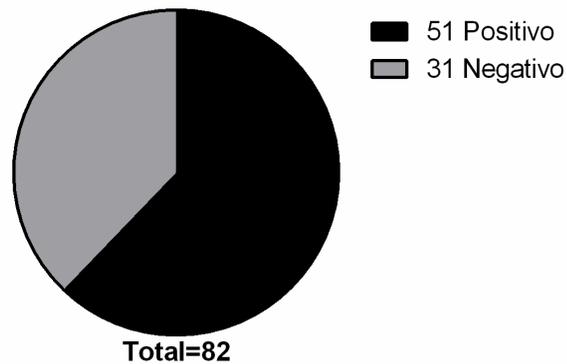
Se observaron también diferencias en la morfología de las artroconidias, como se muestra en la Figura 5. La mayoría de los aislamientos presentaron artroconidias con forma de barril, que se describen como estructuras rectangulares cortas y romas. Sin embargo, algunos aislamientos mostraron artroconidias rectangulares o delgadas y largas.



**Figura 5. Morfologías representativas de las diversas arthroconidias presentes en los aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp. Arthroconidias (a) en forma de barril, (b) rectangulares y (c) delgadas y largas.**

### 6.2.2 Perfil bioquímico

La identificación bioquímica de los aislamientos se obtuvo a partir de su capacidad para hidrolizar la urea y de su perfil de asimilación de carbohidratos. Los resultados de la prueba de actividad ureasa se muestran en la Figura 6. De los 82 aislamientos, sólo el 62.20% mostró capacidad para hidrolizar urea.



**Figura 6. Distribución de aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp. en base a la producción de ureasa.**

La Tabla 7 muestra los diferentes perfiles de asimilación de carbohidratos obtenidos para los 82 aislamientos. Se obtuvieron 32 perfiles bioquímicos, 22 de los cuales correspondieron a un solo aislamiento. En base a estos perfiles se

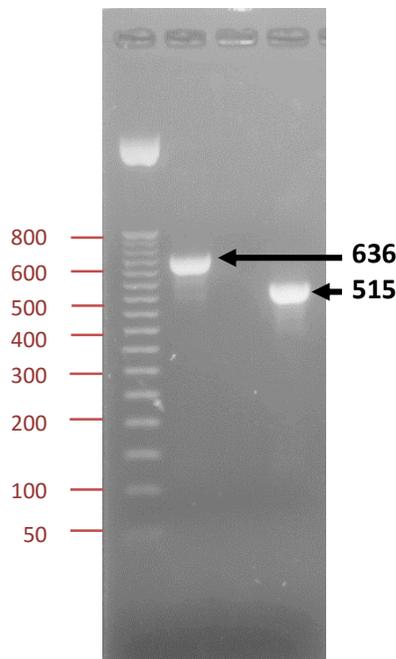
logró identificar *Trichosporon asahii*, *T. inkin* y *T. mucoides*. Tres de los aislamientos fueron identificados como pertenecientes al género *Candida* (perfiles 1, 26 y 32), por lo que fueron removidos del estudio dejando 79 aislamientos para los análisis posteriores. En general, todos los aislamientos de *Trichosporon* fueron capaces de asimilar D-glucosa, 2-ceto-gluconato cálcico, D-xylosa y N-acetil-glucosamina.

**Tabla 7. Perfiles de asimilación de carbohidratos obtenidos para los aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp. y *Candida* sp.**

Perfil	Carbohidratos															No. de aislamientos	Identificación						
	D-glucosa	Glicerol	2-ceto-gluconato cálcico	L-arabinosa	D-xilosa	Adonitol	Xilitol	D-agalactosa	Inositol	D-sorbitol	Metil- $\alpha$ D-glucopiranosido	N-acetil-glucosamina	D-celobiosa	D-lactosa	D-maltosa			D-sacarosa	D-trehalosa	D-melezitosa	D-rafinosa		
1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
2	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.9%
3	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	2	<i>T. asahii</i> 99.9%
4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	<i>T. mucooides</i> 89.9%
5	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	<i>T. mucooides</i> 98.6%
6	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	<i>T. mucooides</i> 96.1%
7	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.9%
8	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	1	<i>T. mucooides</i> 88.6%
9	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.9%
10	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	10	<i>T. asahii</i> 99.9%
11	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	3	<i>T. asahii</i> 99.9%
12	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	18	<i>T. asahii</i> 99.9%
13	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.9%
14	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.9%
15	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	1	<i>T. asahii</i> 97.4%
16	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.9%
17	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.9%
18	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	2	<i>T. asahii</i> 99.9%
19	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	2	<i>T. asahii</i> 99.9%
20	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.8%
21	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	2	<i>T. asahii</i> 99.9%
22	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.9%
23	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	<i>T. mucooides</i> 96.1%
24	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1	<i>T. mucooides</i> 96.1%
25	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	<i>T. mucooides</i> 93.6%
26	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	1	<i>C. albicans</i> 97.4%
27	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	<i>T. mucooides</i> 96.9%
28	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	<i>T. mucooides</i> 94.2%
29	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	<i>T. mucooides</i> 95.9%
30	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	1	<i>T. asahii</i> 99.9%
31	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1	<i>T. inkin</i> 99.9%
32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1	<i>C. glabrata</i>

### 6.2.3 Identificación molecular y genotipificación

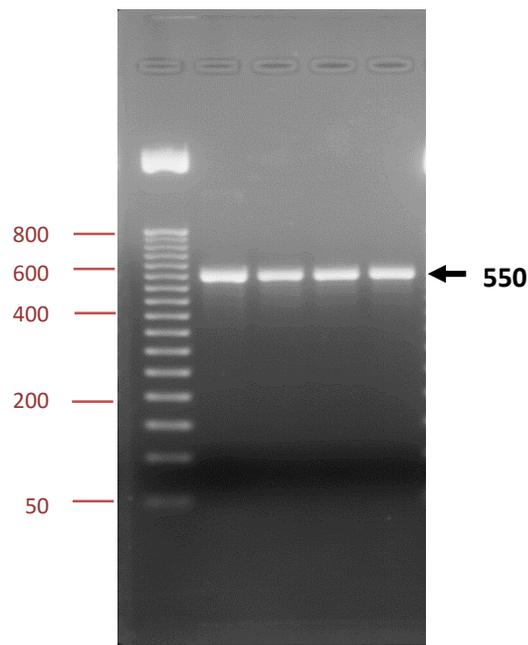
La identificación de los 79 aislamientos restantes se realizó por amplificación y secuenciación de la región ribosomal no codificante IGS1 (Intergenic Sequence 1). En la Figura 7 se muestra un gel representativo de los productos de la amplificación obtenidos. De los 79 aislamientos, en 49 se amplificó una banda de ~636 pb, en 2 una banda de ~515 pb y en 28 no hubo amplicones.



**Figura 7. Gel de agarosa representativo de los fragmentos IGS1 amplificados.**

Los 28 aislamientos sin amplicón para IGS1 corresponden a aislamientos que fueron negativos para actividad ureasa y estuvieron dentro de aquellos que mostraron colonias húmedas, blancas y lisas y que no mostraron artroconidias. Estos 28 aislamientos se sometieron a la amplificación y análisis de la región ITS1-5.8S-ITS2. La Figura 8 muestra un gel representativo de los amplicones

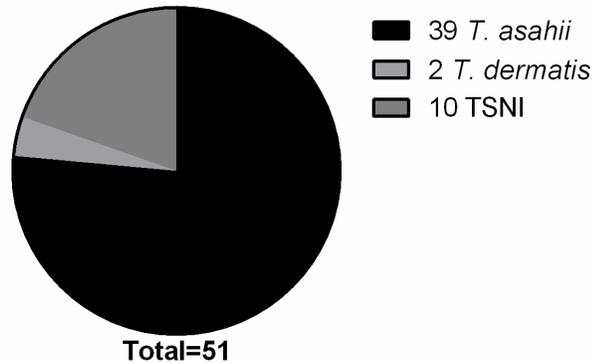
obtenidos para esta región. Todas las muestras mostraron amplicones de ~550 pb. Por homología de secuencias, estos aislamientos fueron identificados como *Candida tropicalis* y corresponden además con 28 de los aislamientos ureasa negativo. Todos los aislamientos correspondientes a *C. tropicalis* fueron removidos del estudio, dejando 51 aislamientos definitivos de *Trichosporon* para análisis posteriores.



**Figura 8. Gel de agarosa representativo de los fragmentos ITS1-5.8S-ITS2 amplificados.**

La Figura 9 muestra la distribución de especies identificadas por secuenciación de la región IGS1. De los 51 aislamientos, 39 fueron identificados como *T. asahii* y 2 como *T. dermatis*. El resto de los aislamientos tuvieron una homología del 80% con la cepa tipo *T. inkin* más cercana, por lo que no pudieron ser identificados satisfactoriamente con IGS1. Para efectos del presente trabajo, estos 10 aislamientos se denominarán *Trichosporon* sp. no identificados (TSNI).

Así, tenemos que el 76.47% de los aislamientos corresponde a *T. asahii*, 19.61% a TSNI y 3.92% a *T. dermatis*.



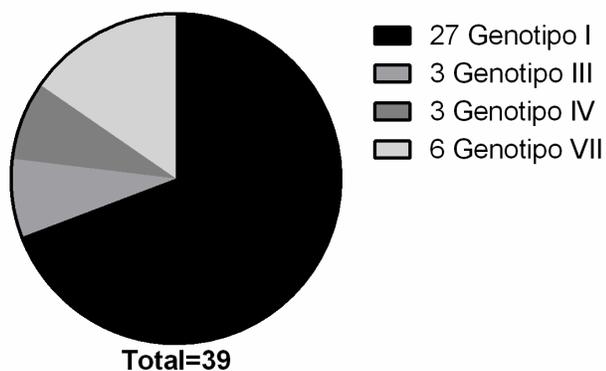
**Figura 9. Distribución de aislamientos de *Trichosporon* sp. en base a la identificación molecular.**

Se observaron discrepancias entre la identificación fenotípica y la identificación por métodos moleculares. La Tabla 8 muestra las especies y cantidad de aislamientos correspondientes identificados por el método comercial API 20C AUX *versus* los aislamientos identificados por secuenciación de las regiones IGS1 e ITS1-5.8S-ITS2. El 78% de los aislamientos de *T. asahii* fue identificado correctamente por el sistema API 20C AUX; sin embargo, ninguno de los aislamientos de *T. dermatis* o TSNI pudo ser identificado por el método convencional.

**Tabla 8. Identificación de aislamientos clínicos por asimilación de carbohidratos y secuenciación.**

API 20C AUX		IGS1/ITS1-5.8S-ITS2	
Especie	No. aislamientos	Especie	No. aislamientos
<i>T. asahii</i>	50	<i>T. asahii</i>	39
		TSNI	8
		<i>C. tropicalis</i>	3
<i>T. inkin</i>	1	TSNI	1
<i>T. mucoides</i>	28	<i>T. dermatis</i>	2
		TSNI	1
		<i>C. tropicalis</i>	25

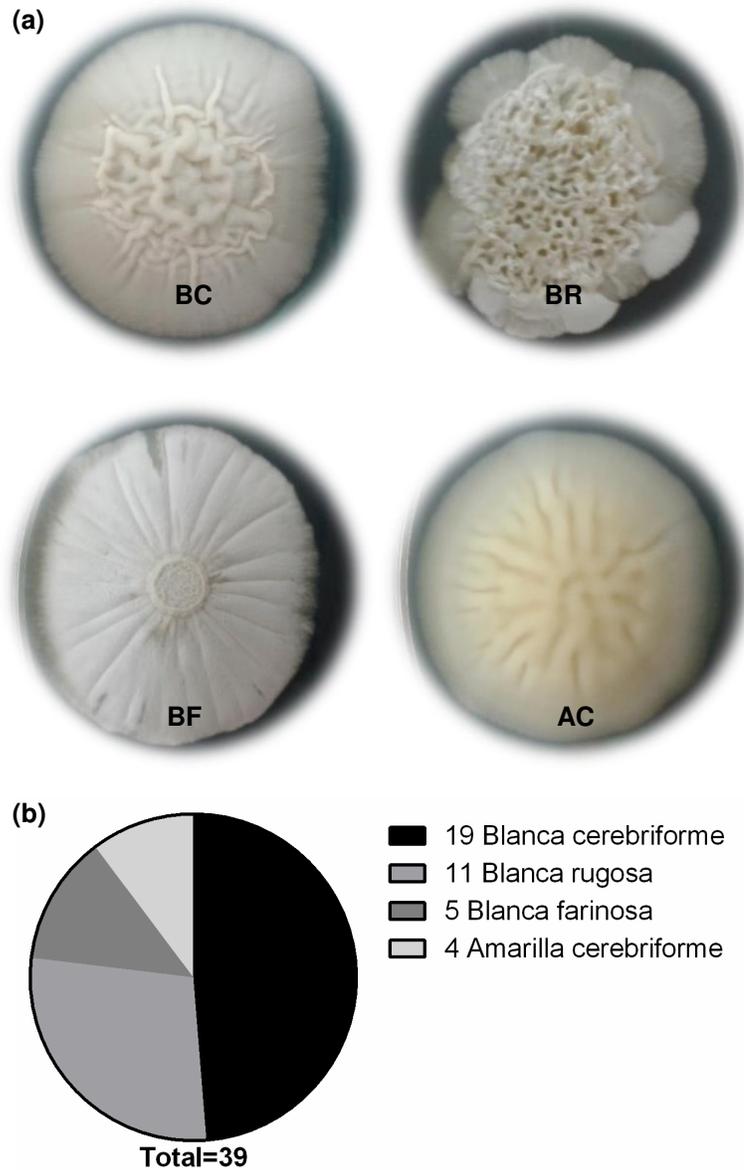
La genotipificación de *T. asahii* se realizó también por homología de la secuencia de la región IGS1. La Figura 10 muestra la distribución de genotipos obtenidas para esta especie. El 69.23% de los aislamientos de *T. asahii* correspondieron al genotipo I, 15.38% al genotipo VII y 7.69% para cada uno de los genotipos III y IV.



**Figura 10. Distribución de genotipos de *T. asahii* por secuenciación de la región IGS1.**

#### 6.2.4 Morfología, perfil bioquímico y origen clínico por especie y genotipo

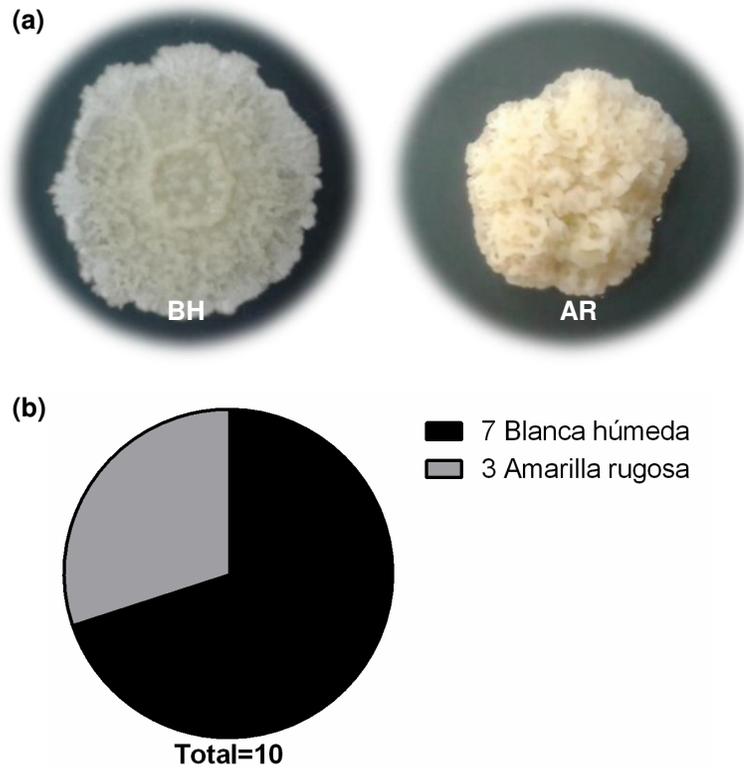
Una vez confirmada la identificación de los aislamientos por métodos moleculares, se logró correlacionar a las diferentes especies con morfologías coloniales específicas. La Figura 11 muestra las diferentes morfologías coloniales y su distribución para *T. asahii*. Se obtuvieron cuatro morfologías características para esta especie: (1) colonias blancas, cerebriformes y secas, BC; (2) colonias blancas o crema claro, muy rugosas y secas, BR; (3) colonias blancas y farinosas, BF; y (4) colonias amarillas, cerebriformes y serosas, AC. Las colonias BC fueron las más frecuentes con el 48.72% de los aislamientos de *T. asahii*, seguidas de las colonias BR con el 28.21%, BF con el 12.82% y finalmente las colonias AC con el 10.26%. No se observó una correlación entre la morfología colonial y el genotipo de *T. asahii*. Microscópicamente, los aislamientos de *T. asahii* mostraron las tres estructuras características del género.



**Figura 11. Morfología colonial de aislamientos clínicos de *T. asahii*.** (a) Colonia blanca cerebriforme seca [BC], blanca o crema rugosa seca [BR], blanca farinosa [BF] y amarilla cerebriforme serosa [AC]. (b) Distribución de aislamientos de *T. asahii* en base a su morfología colonial.

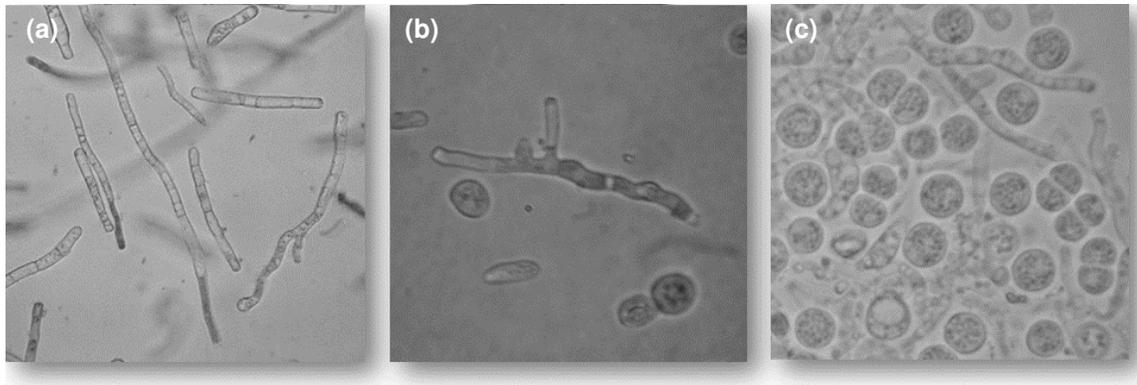
Las morfologías coloniales de TSNI y sus frecuencias se muestran en la Figura 12. Para TSNI se observaron dos morfologías características: (1) colonias blancas, rugosas y húmedas, BH; y (2) colonias amarillas, rugosas y secas, AR.

La morfología más representativa fueron las colonias BH, con el 70% de los aislamientos.



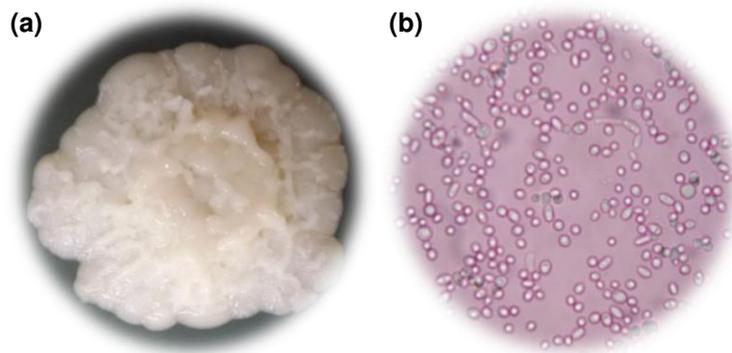
**Figura 12. Morfología colonial de aislamientos clínicos de TSNI.** (a) Colonia blanca rugosa húmeda [BH] y amarilla rugosa seca [AR]. (b) Distribución de aislamientos de TSNI en base a su morfología colonial.

Microscópicamente, TSNI se caracterizó por una ausencia de blastoconidias y una alta presencia de fragmentos hifales ramificados y de sarcinas, como se observa en la Figura 13.



**Figura 13. Morfología microscópica de aislamientos clínicos de TSNI.**  
 (a) Fragmentos hifales largos. (b) Hifas ramificadas. (c) Sarcinas.

Los dos únicos aislamientos de *T. dermatis* mostraron morfología similar, de colonias crema claro, cerebriformes y húmedas, CH. Se observó, además, la presencia de conidias y pseudohifas y una ausencia de fragmentos hifales, como se muestra en la Figura 14.



**Figura 14. Morfología colonial y microscópica de aislamientos clínicos de *T. dermatis*.** (a) Colonia crema cerebriforme húmeda [CH] y (b) conidias y pseudohifas en ausencia de fragmentos hifales.

Respecto al perfil de asimilación de carbohidratos, la Tabla 9 resume el porcentaje de aislamientos que resultaron positivos para la asimilación de cada uno de los carbohidratos evaluados. En general, todos los aislamientos de

*Trichosporon* sp. fueron positivos para D-glucosa, 2-ceto-gluconato cálcico, D-xilosa y N-acetil-glicosamina; y negativos para adonitol y xilitol.

**Tabla 9. Asimilación de carbohidratos de aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp.**

Carbohidratos	% de aislados que asimilan el carbohidrato			
	T. asahii (n=39)	TSNI (n=10)	T. dermatis (n=2)	Total (n=51)
D-glucosa	100	100	100	100
Glicerol	5	20	0	8
2-ceto-gluconato cálcico	100	100	100	100
L-arabinosa	100	70	50	92
D-xilosa	100	100	100	100
Adonitol	0	0	0	0
Xilitol	0	0	0	0
D-galactosa	90	100	100	92
Inositol	0	10	100	6
D-sorbitol	0	0	100	4
Metil- $\alpha$ D-glucopiranosido	85	100	100	88
N-acetil-glicosamina	100	100	100	100
D-celobiosa	97	100	100	98
D-lactosa	97	100	100	98
D-maltosa	97	100	100	98
D-sacarosa	87	100	100	90
D-trehalosa	21	70	50	31
D-melezitosa	15	30	100	22
D-rafinosa	0	10	100	6

La distribución de *T. asahii* y TSNI por origen clínico del aislamiento se representa en la Figura 15. El 74.36% de los aislamientos de *T. asahii* se obtuvieron de muestras provenientes de orina y sangre, mientras que el 25.64% proviene de casos de infecciones superficiales. La mayoría de los aislamientos de TSNI fueron aislados de infecciones superficiales, con 8 aislamientos obtenidos de muestras de pelo y un aislamiento de piel. Sólo un aislamiento de TSNI fue obtenido de orina. Los dos aislamientos de *T. dermatis* se obtuvieron de uñas.

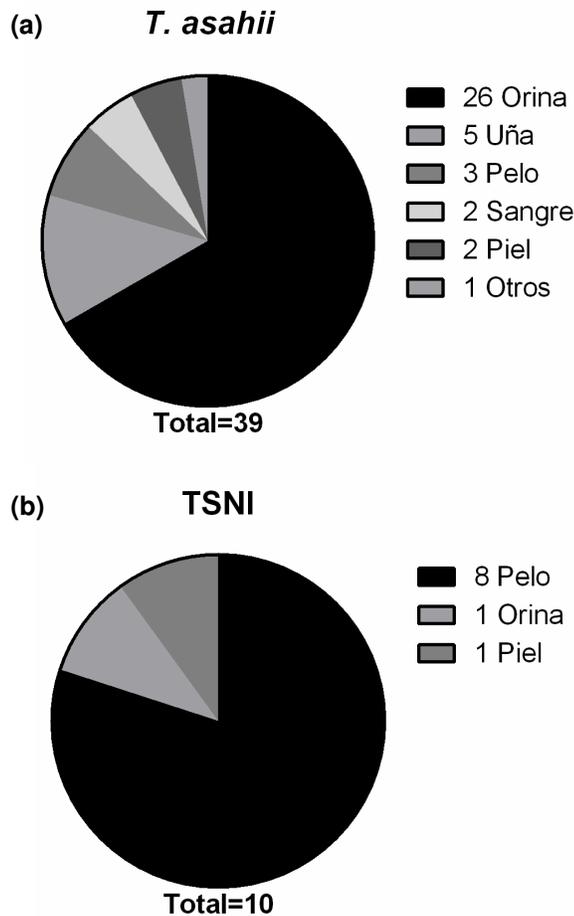


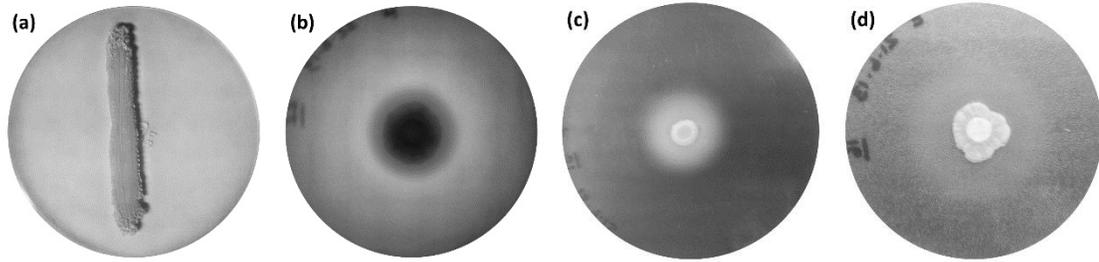
Figura 15. Origen clínico de los aislamientos de (a) *T. asahii* y (b) TSNI.

### 6.3 Producción de factores de virulencia *in vitro*

#### 6.3.1 Compuestos líticos

Los resultados de las pruebas de producción de compuestos líticos se representan en la Figura 16 y se resumen en la Tabla 10. Todos los aislamientos fueron positivos para actividad ADNasa. De manera similar, el 98% del total de los aislamientos mostraron una actividad esterasa muy fuerte. Sólo un aislamiento perteneciente a *T. asahii* genotipo 7 tuvo una muy fuerte actividad

hemolisina. El 33.33% de aislamientos de aislamientos *T. asahii* genotipo I mostraron actividad aspartil-proteasa: 6 aislamientos con actividad muy fuerte y 3 con actividad fuerte. Ninguno de los aislamientos mostró actividad gelatinasa o fosfolipasa.



**Figura 16. Evaluación *in vitro* de (a) ADNasa, (b) hemolisina, (c) aspartil-proteasa y (d) esterasa.**

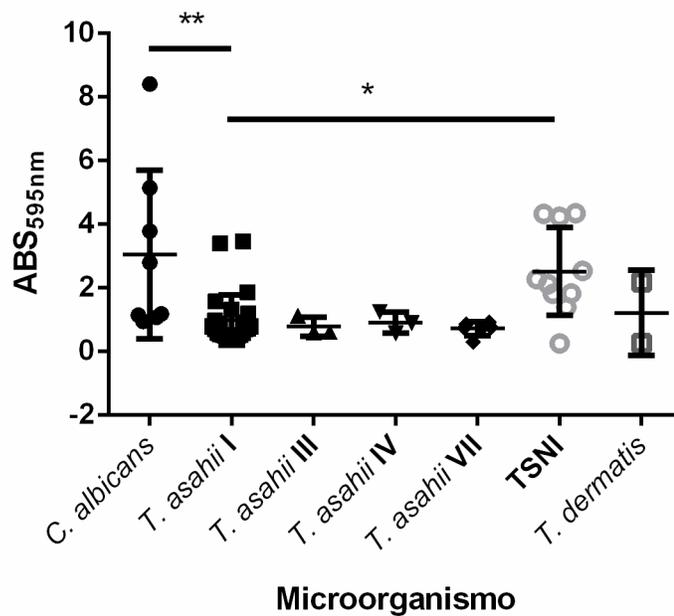
**Tabla 10. Actividad lítica de los aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp.**

Actividad	Valor Pz <sup>a</sup>	No. de aislamientos (%)					
		<i>T. asahii</i>				TSNI	<i>T. dermatis</i>
		Genotipo I (n=27)	Genotipo III (n=3)	Genotipo IV (n=3)	Genotipo VII (n=6)	(n=10)	(n=2)
Gelatinasa							
Positivo		0	0	0	0	0	0
Negativo		27 (100)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	10 (100)	2 (100)
ADNasa							
Positivo		27 (100)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	10 (100)	2 (100)
Negativo		0	0	0	0	0	0
Hemolisina							
Muy fuerte	≤0.69	0	0	0	1 (16.67)	0	0
Negativo	1.0	27 (100)	3 (100)	3 (100)	5 (83.33)	10 (100)	2 (100)
Fosfolipasa							
Negativo	1.0	27 (100)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	10 (100)	2 (100)
Aspartil-proteasa							
Muy fuerte	≤0.69	6 (22.22)	0	0	0	0	0
Fuerte	0.70-0.79	3 (11.11)	0	0	0	0	0
Negativo	1.0	18 (66.67)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	10 (100)	2 (100)
Esterasa							
Muy fuerte	≤0.69	26 (96.30)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	10 (100)	2 (100)
Fuerte	0.70-0.79	1 (3.70)	0	0	0	0	0

<sup>a</sup>Valor Pz: ≤0.69=muy fuerte, 0.70-0.79=fuerte, 0.80-0.89=intermedio, 0.90-0.99=débil, 1.00=negativo.

### 6.3.2 Producción de biopelículas

Se cuantificó la producción de biopelículas *in vitro* de los 51 aislamientos empleando una fase de adhesión de 4 h. La Figura 17 muestra la absorbancia obtenida para cada uno de los aislamientos por especie y/o genotipo. Aún y cuando todos los aislamientos formaron biopelículas, en general se observó una diferencia significativa en comparación con la producción de biopelículas por *C. albicans*, que se empleó en los ensayos como control positivo ( $P=0.025$ ). Sólo los aislamientos de TSNI mostraron una producción equiparable a la de *C. albicans*.



**Figura 17. Producción de biopelículas de aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp.**

Para correlacionar la producción de biopelículas con las diferentes especies y/o genotipos y con el origen clínico, se estableció una clasificación arbitraria de

fenotipo productor basado en los cuartiles de absorbancia obtenidos para los aislamientos de *Trichosporon* totales. Así, obtuvimos las clasificaciones de: productores débiles ( $\leq 0.575$ ), intermedios (0.576-0.833), fuertes (0.834-0.999) y muy fuertes ( $\geq 1.0$ ). Se obtuvieron 13 aislamientos clasificados como productores débiles, 12 intermedios, 8 fuertes y 18 muy fuertes. La Tabla 11 muestra los fenotipos productores de los aislamientos de acuerdo a la especie y/o genotipo. Los aislamientos de *T. asahii* se distribuyeron entre los diferentes fenotipos productores como: débiles (11), intermedios (12), fuertes (8) y muy fuertes (8). El 90% de los aislamientos de TSNi fueron productores muy fuertes, mientras que sólo 1 aislamiento mostró una producción débil. *T. dermatis* presentó 1 aislamiento débil y 1 aislamiento muy fuerte. En cuanto a la producción de biopelícula, se observó una correlación significativa entre el fenotipo productor y la especie y/o genotipo ( $P=0.022$ ).

**Tabla 11. Fenotipo productor de biopelículas de los aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp.**

Especie	Fenotipo productor de biopelículas				Total
	Débil	Intermedio	Fuerte	Muy fuerte	
<i>T. asahii</i> I	10	6	5	6	27
<i>T. asahii</i> III	0	2	0	1	3
<i>T. asahii</i> IV	0	1	1	1	3
<i>T. asahii</i> VII	1	3	2	0	6
TSNI	1	0	0	9***	10
<i>T. dermatis</i>	1	0	0	1	2
Total	13	12	8	18	51

\*\*\* $P < 0.001$

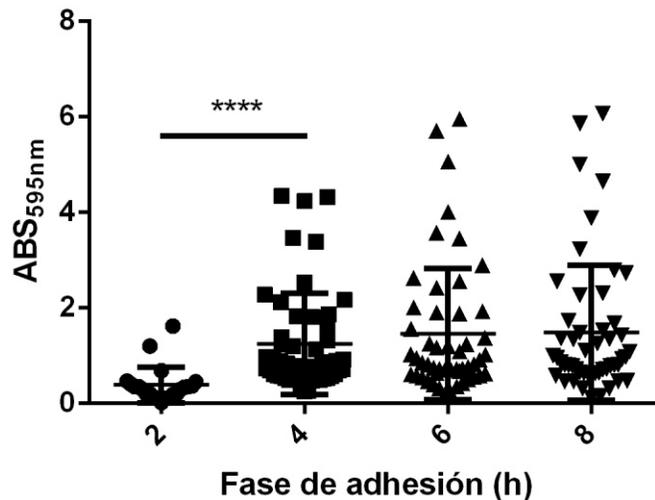
El fenotipo productor de biopelículas en relación al origen clínico de los aislamientos se muestra en la Tabla 12. Se observó una correlación significativa entre los aislamientos obtenidos de pelo y una muy fuerte producción de biopelículas ( $P=.0.036$ )

**Tabla 12. Distribución del fenotipo productor de biopelículas en base al origen clínico de los aislamientos**

Origen	Fenotipo productor de biopelículas				Total
	Débil	Intermedio	Fuerte	Muy fuerte	
Orina	9	5	6	7	27
Pelo	1	1	1	8**	11
Uña	1	5	0	1	7
Piel	0	0	1	2	3
Sangre	1	1	0	0	2
Otros	1	0	0	0	1
Total	13	12	8	18	51

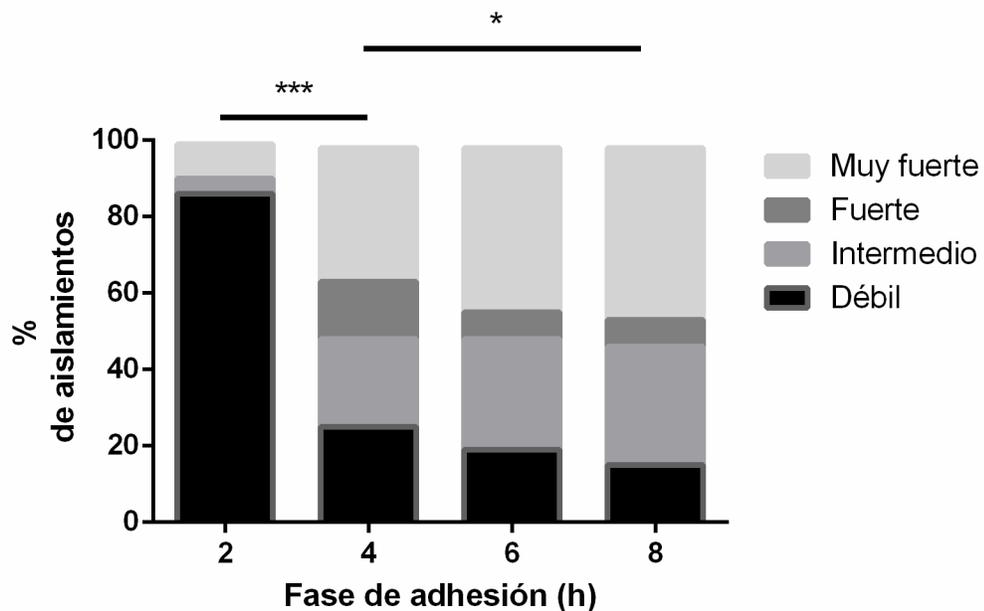
\*\* $P=0.004$

Se extendió el análisis de producción de biopelículas para incluir diferentes fases de adhesión. La producción de biopelícula de los 51 aislamientos empleando fases de adhesión de 2, 4, 6 y 8 h se representa en la Figura 18. La mediana de absorbancia obtenida para cada una de los tiempos fue de  $A_{595}=0.322$ , 0.834, 0.858 y 0.933, respectivamente. Se observó un incremento significativo en la producción con fases de adhesión de 4 h o más ( $P<0.0001$ ).



**Figura 18. Producción de biopelículas de los aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp. empleando diferentes fases de adhesión.**

Para evaluar si el tiempo de incubación de la fase de adhesión tendría un efecto en la clasificación de los aislamientos, se comparó la proporción de aislamientos que fueron re-clasificados al cambiar el tiempo de incubación de la fase de adhesión. La proporción de aislamientos pertenecientes a cada fenotipo productor en base a la fase de adhesión se puede observar en la Figura 19. Al incrementar la fase de adhesión de 2h a 4 h, el 77.27% de los aislamientos aumentaron su producción. Al comparar los fenotipos productores obtenidos con fases de adhesión de 4 h y 8 h, se observó que un 31.37% de los aislamientos aumentó la producción de biopelículas, mientras que el 11.76% de los aislamientos disminuyó su producción. Esto sugiere que el incremento en el tiempo de la fase de adhesión tiene un efecto significativo sobre la producción de biopelículas ( $P \leq 0.033$ ).



**Figura 19. Fenotipos productores de biopelículas obtenidos con diferentes fases de adhesión.**

### 6.3.3 Perfiles *in vitro* de factores de virulencia

Los diferentes perfiles de factores de virulencia obtenidos *in vitro* para cada especie se resumen en la Tabla 13. Los aislamientos de *T. asahii* mostraron comportamientos muy variados en cuanto a la producción de compuestos líticos y biopelículas. TSNI arrojó el mismo perfil de virulencia para el 90% de los aislamientos pertenecientes a esta especie. Cada uno de los aislamientos de *T. dermatis* mostró diferentes perfiles. No se logró establecer una correlación entre el perfil de virulencia y la especie o genotipo del aislamiento.

**Tabla 13. Perfiles *in vitro* de factores de virulencia de los aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp.**

Microorganismo	Factor de virulencia			Fenotipo productor de biopelícula <sup>a</sup>	No. aislamientos
	Compuesto lítico		Esterasa		
	Hemolisina	Aspartil-proteasa			
<i>T. asahii</i>	+	-	+	MF/F	1
	-	+	+	MF/F	5
	-	+	+	I/D	4
	-	-	+	MF/F	10
	-	-	+	I/D	19
TSNI	-	-	+	MF/F	9
	-	-	+	I/D	1
<i>T. dermatis</i>	-	-	+	MF/F	1
	-	-	+	I/D	1

<sup>a</sup>MF/F: muy fuerte/fuerte; I/D: intermedio/débil.

## 6.4 Susceptibilidad a antifúngicos

### 6.4.1 Susceptibilidad de células planctónicas

La susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos de *Trichosporon* se resumen en la Tabla 14. De los 51 aislamientos, el 42% tuvo una CMI de  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  para AMB.

El 96% de los aislamientos tuvieron una CMI de  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  para las tres equinocandinas; sólo 2 aislamientos de TSNI mostraron susceptibilidad estos antifúngicos. Respecto a VRC, PSC y FLC, los aislamientos mostraron susceptibilidad con CMIs de 0.03-0.06, 0.03-0.125, y 0.25-0.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Para 5FC, se observó una respuesta variable: el 35% de los aislamientos mostraron CMIs de  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ .

**Tabla 14. Susceptibilidad *in vitro* de células planctónicas de aislamientos de *Trichosporon* sp.**

Antifúngico	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	<i>T. asahii</i>			
	Rango	MG <sup>a</sup>	CMI <sub>50</sub> <sup>b</sup>	CMI <sub>90</sub> <sup>c</sup>
AMB	0.5-16	1.84	2	4
ANI	1->8	ND	>8	>8
MIC	>8	ND	>8	>8
CAS	8->8	ND	8	>8
VRC	0.03-1	0.04	0.03	0.06
PSC	0.03-0.5	0.08	0.06	0.25
FLC	0.125-16	0.78	0.5	2
5FC	4->64	ND	0.5	4

	TSNI				<i>T. dermatis</i>
	Rango	MG <sup>a</sup>	CMI <sub>50</sub> <sup>b</sup>	CMI <sub>90</sub> <sup>c</sup>	Rango
AMB	1-4	1.22	1	1	1-2
ANI	1->8	ND	>8	>8	8->8
MIC	>8	ND	>8	>8	>8
CAS	2->8	ND	4	8	8->8
VRC	0.03-0.125	0.04	0.03	0.06	0.06
PSC	0.03-0.125	0.05	0.03	0.125	0.125
FLC	0.125-1	0.28	0.25	0.5	0.5-1
5FC	8->64	ND	16	16	64

<sup>a</sup>media geométrica; <sup>b</sup>CMI a la que el 50% de los aislamientos fueron inhibidos; <sup>c</sup>CMI a la que el 90% de los aislamientos fueron inhibidos; ND: no determinado.

#### 6.4.2 Susceptibilidad de biopelículas

Las lecturas de CMIs para las pruebas de susceptibilidad *in vitro* ante AMB y FLC para células planctónicas y biopelículas fueron realizadas a las 48 h de incubación. Los rangos, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de los 51 aislamientos se resumen en la

Tabla 15. Al comparar la susceptibilidad de biopelículas contra la de células planctónicas, se observó un incremento en la resistencia a los antifúngicos evaluados, ya que las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> para biopelículas fueron mayores que las concentraciones necesarias para la inhibición de células planctónicas. En general, la resistencia aumentó  $\geq 2 \log_2$  veces para AMB y  $\geq 9 \log_2$  veces para FLC. Se logró observar una tendencia al incremento en la resistencia a medida que aumentó la producción de biopelículas, particularmente para FLC. Para este antifúngico, se observó un aumento del  $\geq 7 \log_2$  en la resistencia para productores débiles, un incremento de  $\geq 8 \log_2$  para productores intermedios, y un aumento en la resistencia de  $\geq 10 \log_2$  para productores fuertes y muy fuertes.

**Tabla 15. Susceptibilidad *in vitro* de células planctónicas y biopelículas en base al fenotipo productor.**

Categoría	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	Anfotericina B					
	Planctónicas			Biopelícula		
	Rango	CMI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	CMI <sub>90</sub> <sup>b</sup>	Rango	CMI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	CMI <sub>90</sub> <sup>b</sup>
Total	0.5-16	1	4	1->16	4	>16
Fenotipo productor						
Débil	0.5-16	1	4	1->16	4	16
Intermedio	1-8	1	2	2->16	8	16
Fuerte	1-4	2	2	1->16	4	16
Muy Fuerte	1-4	1	2	1->16	4	>16
	Fluconazol					
	Planctónicas					
	Planctónicas			Biopelícula		
	Rango	CMI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	CMI <sub>90</sub> <sup>b</sup>	Rango	CMI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	CMI <sub>90</sub> <sup>b</sup>
Total	0.13-16	0.5	2	32->512	>512	>512
Fenotipo productor						
Débil	0.13-4	0.5	2	32->512	64	>512
Intermedio	0.5-1	0.5	0.5	32->512	128	>512
Fuerte	0.13-16	1	1	32->512	>512	>512
Muy Fuerte	0.13-1	0.25	1	32->512	>512	>512

<sup>a</sup>CMI a la que el 50% de los aislamientos fueron inhibidos; <sup>b</sup>CMI a la que el 90% de los aislamientos fueron inhibidos.

## 6.5 Estudios *in vivo*

### 6.5.1 Modelo murino

En base a los resultados obtenidos previamente, se eligieron tres cepas de *T. asahii* para la realización de un modelo murino de tricosporonosis que permitiera el estudio de carga fúngica utilizando parámetros microbiológicos e histopatológicos durante el establecimiento de una infección sistémica. Las cepas empleadas en el modelo murino se eligieron en base a su actividad lítica *in vitro*, resumida en la Tabla 16. Todos los aislamientos fueron positivos para ADNasa y no mostraron actividad fosfolipasa. La cepa 07-230 mostró una muy fuerte actividad hemolisina, la cepa 09-206 tuvo la actividad esterasa más alta, y la cepa 09-928 mostró una muy fuerte actividad aspartil-proteasa.

**Tabla 16. Perfiles enzimáticos de los tres aislamientos de *T. asahii* incluidos en el modelo murino.**

Cepa	Origen clínico	Valor Pz <sup>a</sup> (±DE)				
		ADNasa	Aspartil-proteasa	Esterasa	Hemolisina	Fosfolipasa
07-230	Piel	Positivo	1.00	0.53 (±0.06)	0.58 (±0.02)	1.00
09-206	Orina	Positivo	1.00	0.38 (±0.06)	1.00	1.00
09-928	Orina	Positivo	0.37 (±0.07)	0.51 (±0.01)	1.00	1.00

DE: desviación estándar.

<sup>a</sup>Valor Pz: ≤0.69=muy fuerte, 0.70-0.79=fuerte, 0.80-0.89=intermedio, 0.90-0.99=débil, 1.00=negativo.

Los ratones fueron monitoreados durante el curso del modelo experimental. Se observó pilo-erección en los animales durante los primeros 4 días post-

infección y no se observó pérdida de peso ni algún impedimento neurológico notable.

### 6.5.2 Análisis de carga fúngica tisular

Los resultados de la carga fúngica tisular se resumen en la Tabla 17. En general, la mayor carga fúngica de las tres cepas se detectó en el riñón, seguida del bazo y el hígado durante los tres días experimentales. Las tres cepas mostraron un decremento significativo de carga fúngica en los tres órganos a partir del día 3, exceptuando riñones de las cepas 07-230 y 09-206. Se observó además una diferencia significativa entre la carga fúngica en riñón de la cepa 09-206 y la carga de las cepas 07-230 y 09-928 al día 7 post-infección ( $P=0.002$ ).

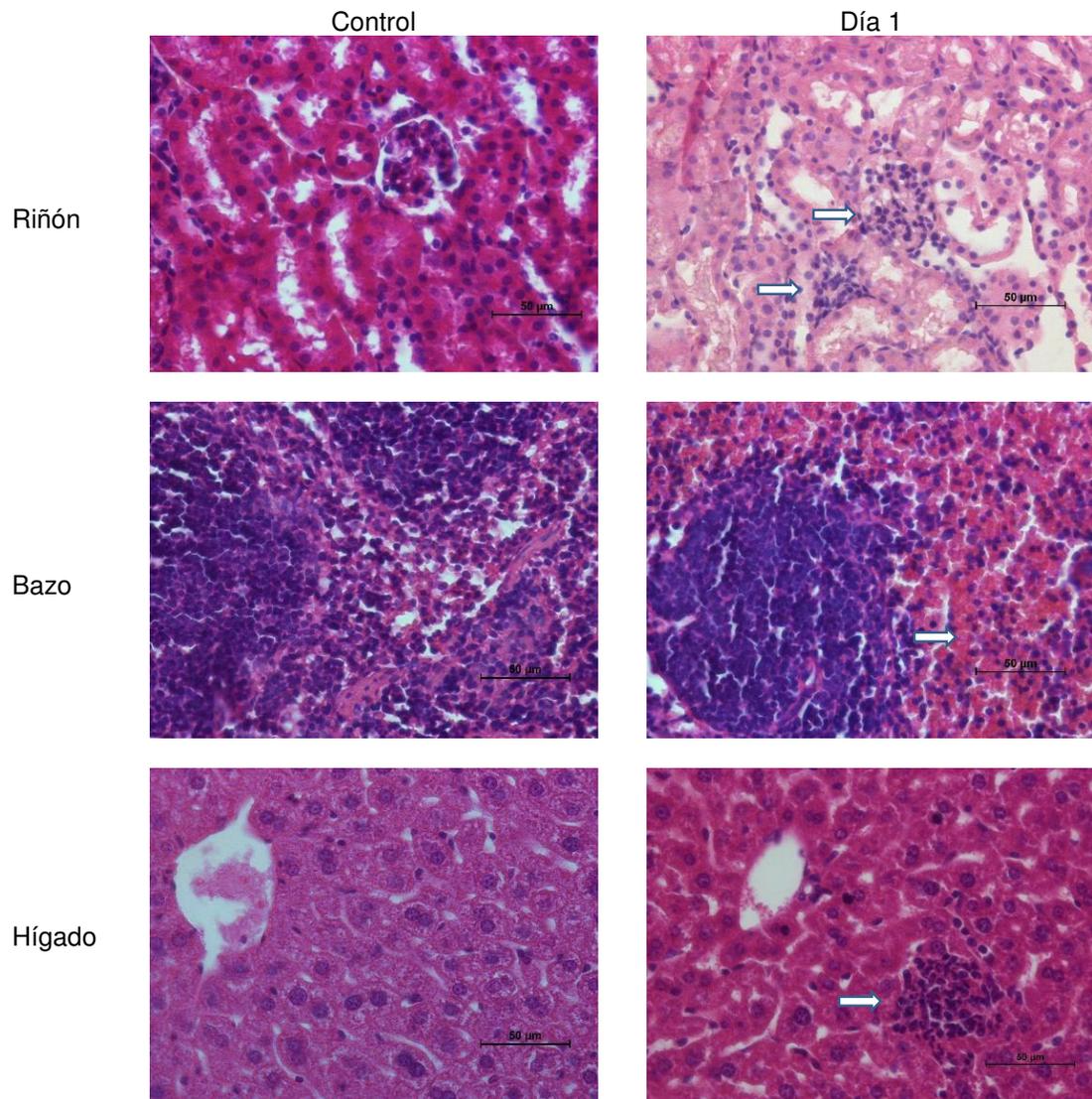
**Tabla 17. Carga fúngica en tejido de ratones infectados intravenosamente con  $1 \times 10^6$  UFC/ratón.**

Cepa	Órgano	Log <sub>10</sub> UFC/g tejido [mediana (rango)]		
		Día 1	Día 3	Día 7
07-230	Riñón	4.32 (4.06-4.42)	4.18 (4.07-4.82)	3.27 (3.09-3.90)**
	Bazo	3.90 (3.77-4.08)	2.93 (2.64-3.32)**	1.03 (0-2.18)**
	Hígado	3.96 (3.66-4.21)	2.87 (2.64-2.99)**	0.69 – (0-1.70)**
09-206	Riñón	4.76 (4.56-5.13)	4.75 (4.60-4.95)	4.72 (4.27-4.94)
	Bazo	4.34 (4.16-4.51)	3.48 (3.38-3.66)**	2.54 (2.39-2.70)**
	Hígado	4.44 (4.25-4.71)	3.28 (3.12-3.33)**	1.70 (1.49-1.83)**
09-928	Riñón	5.33 (5.28-5.55)	4.54 (4.46-4.59)**	3.22 (2.66-4.18)**
	Bazo	5.10 (4.96-5.34)	3.50 (3.24-3.78)**	2.41 (0-2.71)**
	Hígado	4.80 (4.65-4.97)	2.97 (2.89-3.28)**	0.85 (0-2.15)**

$P=0.002$  vs. resultados del día experimental anterior.

### 6.5.3 Histopatología

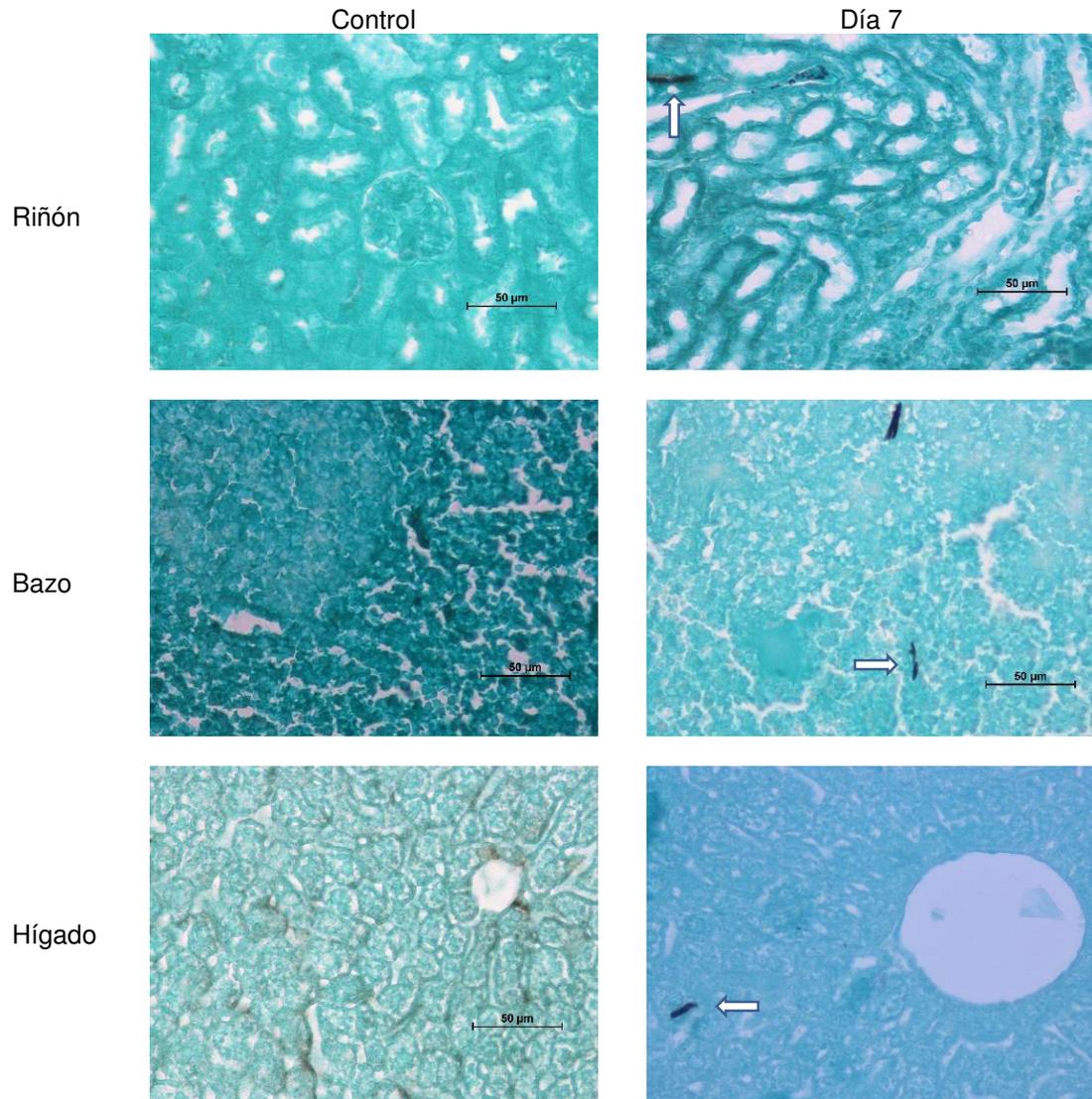
El análisis histopatológico por tinción con hematoxilina-eosina se muestra en la Figura 20. Los tejidos mostraron evidencia de infiltrado inflamatorio caracterizado por células polimorfonucleares en los sinusoides del hígado, asociado a la presencia de *T. asahii*. En general, la cepa 09-206 mostró mayor infiltrado, seguido de las cepas 09-928 y 07-230. Abundantes células polimorfonucleares fueron observadas en sinusoides esplénicos y cordones esplénicos de la pulpa roja en bazo. En riñón, durante los 3 días experimentales la cepa 09-206 mostró infiltrado inflamatorio en la corteza renal, en corpúsculos renales y túbulos proximales, y escaso infiltrado entre los túbulos renales de la médula renal. Las cepas 07-230 y 09-928 exhibieron infiltrado en corpúsculos renales y tubos proximales en el día 3, que disminuyó hacia el día 7 post-infección.



**Figura 20. Secciones representativas de riñón, bazo e hígado de ratones BALB/c infectados intravenosamente con  $1 \times 10^6$  UFC/ratón evaluadas el día 1 post-infección. Tinción hematoxilina-eosina. Barra equivale a 50  $\mu$ m.**

Los análisis histológicos por tinción Grocott-Gomori se muestran en la Figura 21. En relación a la presencia de *T. asahii* en tejido, el análisis muestra la presencia de escasas conidias y fragmentos hifales en los sinusoides del hígado y en la pulpa roja y nódulos linfoides de la pulpa blanca en bazo. En riñones, se pueden observar fragmentos hifales y escasas conidias la corteza. Los riñones

infectados con la cepa 09-206 muestran evidencia de presencia del hongo entre los túbulos renales de la médula.



**Figura 21. Secciones representativas de riñón, bazo e hígado de ratones BALB/c infectados intravenosamente con  $1 \times 10^6$  UFC/ratón evaluadas el día 7 post-infección. Tinción Grocott-Gomori. Barra equivale a 50 µm.**

## 6.6 Producción de citocinas en suero

Los resultados de la cuantificación de citocinas en suero a los días 1 y 7 post-infección se resumen en la Tabla 18. Se observó una diferencia significativa en la producción de G-CSF para ambas cepas en comparación con el control en el día 1 post-infección ( $P \leq 0.05$ ). Similarmente, *T. asahii* 09-298 mostró una diferencia significativa en la producción de IFN- $\gamma$  en el día 1 post-infección en comparación con el control y la misma cepa al día 7 post-infección ( $P \leq 0.05$ ). Ambas cepas mostraron una mayor producción de IL-6 al día 1 post-infección *versus* el control ( $P \leq 0.05$ ). Se observó también una diferencia significativa en la producción de TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0.05$ ). Se detectó un ligero incremento en la producción de IL-2 en los dos días evaluados para ambas cepas. No se observó producción de las citocinas IL-4, IL-10 e IL-17A para ninguna cepa o día evaluado.

**Tabla 18. Citocinas en suero de ratones BALB/c infectados intravenosamente con  $1 \times 10^6$  UFC/ratón evaluadas los días 1 y 7 post-infección.**

Citocina	pg/ml Media ( $\pm$ EEM)					Valor- $P^a$
	Control	Día 1		Día 7		
		09-206	09-928	09-206	09-928	
G-CSF	284.7 ( $\pm$ 23.67)	1701.0 ( $\pm$ 456.6)*	1187 ( $\pm$ 319.0)	334.4 ( $\pm$ 51.43)	783.2 ( $\pm$ 345.8)	0.008
TNF- $\alpha$	0	10.10 ( $\pm$ 3.43)	8.70 ( $\pm$ 2.26)	1.65 ( $\pm$ 1.65)	1.11 ( $\pm$ 1.11)	0.005
IFN $\gamma$	0	5.57 ( $\pm$ 1.75)	29.60 ( $\pm$ 4.48)**	0.51 ( $\pm$ 0.51)	0.43 ( $\pm$ 0.43)	0.0008
IL-6	0	187.90 ( $\pm$ 117.70)*	19.16 ( $\pm$ 3.14)*	2.68 ( $\pm$ 1.55)	0.82 ( $\pm$ 0.61)	0.0017
IL-2	1.06 ( $\pm$ 0.29)	3.33 ( $\pm$ 2.06)	5.22 ( $\pm$ 2.54)	3.10 ( $\pm$ 2.07)	3.34 ( $\pm$ 1.90)	0.589
IL-4	0	1.63 ( $\pm$ 1.63)	3.26 ( $\pm$ 2.00)	1.60 ( $\pm$ 1.60)	1.58 ( $\pm$ 1.58)	0.762
IL-17A	0	0.78 ( $\pm$ 0.78)	1.11 ( $\pm$ 0.68)	0.51 ( $\pm$ 0.51)	0.60 ( $\pm$ 0.60)	0.805
IL-10	0	0.36 ( $\pm$ 0.36)	2.92 ( $\pm$ 1.92)	0.49 ( $\pm$ 0.49)	0.32 ( $\pm$ 0.32)	0.659

EEM: error estándar de la media; <sup>a</sup> Kruskal-Wallis; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  calculado con prueba de Dunn.

## CAPÍTULO 7

### DISCUSIÓN

*Trichosporon* sp. está asociado principalmente a piedra blanca; sin embargo, en las últimas décadas este microorganismo ha adquirido importancia como agente de infecciones oportunistas sistémicas desde el primer caso reportado en 1970<sup>32</sup>. Su amplia distribución, resistencia a algunos antifúngicos y el incremento del número de pacientes pertenecientes a grupos de riesgo son factores que han hecho relevante el estudio de especies pertenecientes a este género.

Debido a su naturaleza como agente de infecciones superficiales y diseminadas, especies patógenas de *Trichosporon* pueden ser aisladas de una variedad de orígenes clínicos. El 74.36% de nuestros aislamientos de *T. asahii* fueron aislados de muestras provenientes de infecciones profundas, principalmente orina (66.67%). Aún y cuando *T. asahii* se ha asociado a infecciones superficiales,<sup>81,82</sup> esta especie está principalmente asociada a tricosporonosis, siendo aislada en la mayoría de los casos de muestras de sangre, orina y esputo<sup>33,55,83–88</sup>. De manera similar, *T. dermatis* se ha reportado en casos de infecciones diseminadas y fungemias<sup>33,89,90</sup>; sin embargo, nuestros dos aislamientos identificados como *T. dermatis* fueron aislados de uñas.

La identificación precisa de las especies es esencial para el diagnóstico y tratamiento oportuno de los pacientes. El análisis morfológico es un método esencial en la identificación de hongos. Si bien se observó una variabilidad en las colonias producidas tanto inter- como intra-específicamente, todos los aislamientos incluidos en el presente trabajo mostraron una morfología colonial característica del género *Trichosporon*: colonias cerebriformes o rugosas de color blanco a amarillo claro.

Microscópicamente, *T. asahii* presentó las tres estructuras representativas del género. En contraste, los aislamientos de TSNI no presentaron blastoconidias, mientras que *T. dermatis* se caracterizó por presentar exclusivamente blastoconidias y pseudohifas. Para el análisis morfológico se emplearon el medio y condiciones de cultivo recomendadas para *Trichosporon* spp. La ausencia de algunas estructuras en los cultivos se pudiera deber a características intrínsecas del microorganismo. Se ha reportado que *T. cutaneum* es capaz de desarrollar hifas sólo tras ser sub-cultivada repetidamente<sup>65</sup>. Por otro lado, es sabido que algunos hongos pueden no presentar las morfologías características del grupo al que pertenecen. Por ejemplo, *Candida glabrata* no produce pseudohifas, estructuras presentes en miembros del género *Candida*,<sup>91</sup> o la ausencia de microconidias en *Epidermophyton* spp., las cuales son características de dermatofitos<sup>92</sup>.

Las pruebas bioquímicas son ampliamente usadas en la identificación de hongos levaduriformes. Estas pruebas pueden incluir diversos paneles como asimilación y fermentación de carbohidratos, asimilación de compuestos

nitrogenados, o ensayos de hidrólisis como la actividad ureasa o catalasa. En el presente trabajo se obtuvieron los perfiles de asimilación de carbohidratos empleando el sistema comercial API 20C AUX. Este sistema ha demostrado tener una eficiencia similar o mayor que otros métodos bioquímicos sistematizadas o convencionales en la identificación de levaduras, ya sean patógenos comunes o poco frecuentes<sup>93-98</sup>. Sin embargo, éste sistema bioquímico tiene la limitante de incluir sólo tres especies patógenas de *Trichosporon* en su panel de identificaciones: *T. asahii*, *T. inkin* y *T. mucoides*. Si bien este sistema ha sido empleado exitosamente para la identificación de aislamientos de *T. asahii*,<sup>83,99,100</sup> se han reportado discrepancias al comparar la identificación empleando este sistema y la identificación por métodos moleculares. Se han reportado aislamientos de *Trichosporon* spp. que se identificaron erróneamente como *Cryptococcus* spp.<sup>33</sup> o no pudieron ser identificados, incluyendo especies de *T. asahii*<sup>53,55</sup>. Guo y cols. reportaron que sólo el 82.05% de sus aislamientos de *T. asahii* pudieron ser identificados por API<sup>55</sup>. En nuestro estudio, el total de los aislamientos de *T. asahii* fueron identificados correctamente por este sistema. Sin embargo, 11 aislamientos identificados por API como *T. asahii* correspondieron a cepas TSN1 o *Candida tropicalis*. De manera similar, 25 aislamientos de *C. tropicalis* se identificaron erróneamente como *T. mucoides*. Además, los dos aislamientos de *T. dermatis* fueron identificados como *T. mucoides*, de acuerdo a lo previamente reportado<sup>33,55</sup>.

En nuestra experiencia, un reto de la identificación bioquímica se resolvió al complementar el perfil de asimilación de carbohidratos con un ensayo de actividad ureasa, ya que esta prueba nos permitió detectar a aquellos aislamientos de *C. tropicalis* que fueron erróneamente identificados como *Trichosporon* sp. Sin embargo, la identificación precisa de *Trichosporon* a nivel de especie requirió de la confirmación empleando métodos moleculares.

A la fecha, la identificación molecular de especies de *Trichosporon* se basa en el análisis de secuencias IGS1. Esta región conservada ha mostrado una mayor diversidad intra-específica en comparación con otras regiones genómicas empleadas para la identificación de hongos, como ITS o D1/D2,<sup>46,55</sup> lo que hace al análisis de IGS1 una mejor opción para la identificación de especies de *Trichosporon* filogenéticamente cercanas. Sin embargo, 10 de nuestros aislamientos no pudieron ser satisfactoriamente identificados por secuenciación de IGS1. Este fenómeno ha sido reportado recientemente por Rastogi y cols<sup>101</sup>. La inhabilidad de IGS1 para identificar algunos aislamientos de *Trichosporon* se puede deber a que las secuencias de algunas especies no se encuentran disponibles en las bases de datos de referencia, o que dichos aislamientos sean especies aún no descritas en cuyo caso se requiere de una caracterización más completa de dichos aislamientos.

La región IGS1, además de emplearse para la identificación de *Trichosporon* spp., permite la genotipificación de aislamientos de *T. asahii*. A la fecha, se han reportado 15 genotipos. De éstos, los genotipos I, III, IV y VII fueron identificados entre nuestros aislamientos. El genotipo I fue el más predominante, similar a lo

reportado previamente en Brasil<sup>54,88</sup>, España<sup>84</sup>, Turquía<sup>102</sup>, Taiwán<sup>103</sup> y Tailandia<sup>104</sup>. El genotipo III ha sido reportado como el de mayor frecuencia en Argentina e India, seguido del genotipo I<sup>101,105</sup>. El genotipo IV ha sido el más ampliamente reportado en China, seguido del genotipo III<sup>41,55</sup>, mientras que el genotipo VII se ha reportado en Tailandia y Japón<sup>104</sup>.

La habilidad infectiva de los hongos depende de diversos mecanismos que ayudan a los microorganismos durante el consumo de nutrientes, invasión de tejidos, adherencia, resistencia y diseminación en el hospedero<sup>106</sup>. El estudio de estos factores de virulencia ha contribuido al entendimiento de la patogénesis durante infecciones por *Candida albicans*,<sup>107</sup> *Cryptococcus* spp.<sup>108</sup> y *Aspergillus fumigatus*<sup>109</sup>. A pesar de la importancia de los factores de virulencia en la patogenia de los microorganismos, se sabe poco respecto a la producción de éstos y su papel durante las infecciones por *Trichosporon*. En el presente trabajo determinamos la producción de diversos compuestos líticos y biopelículas por parte de los diferentes aislamientos clínicos evaluados.

La gelatinasa es una enzima lítica que hidroliza gelatina y colágeno del tejido conectivo de manera que sus componentes puedan ser usados como nutrientes por el microorganismo.<sup>110</sup> Todos nuestros aislamientos fueron negativos para actividad gelatinasa. Sólo un trabajo ha evaluado la actividad de este compuesto lítico en aislamientos clínicos de *T. dermatis* y *T. debeurmannianum*, donde ninguno de los 3 aislamientos evaluados produjo dicha actividad<sup>111</sup>.

Las ADNasas se han estudiado principalmente en bacterias, donde se ha demostrado que pueden estar involucradas en la adquisición de nutrientes,<sup>112</sup> la maduración de biopelículas<sup>113</sup> y la evasión del sistema inmune<sup>114</sup>. La actividad ADNasa fue recientemente reportada en 17 de 27 aislamientos clínicos de *T. asahii*, *T. inkin*, *T. mucoides* y *T. ovoides*<sup>115</sup>. Sin embargo, nosotros encontramos que el 100% de los aislamientos de *T. asahii*, *T. dermatis* y TSN1 mostraron actividad ADNasa a los 7 días de incubación.

Las fosfolipasas están involucradas en la disrupción de las membranas celulares del hospedero<sup>116</sup>. En nuestro estudio, ninguno de los aislamientos fue positivo para actividad fosfolipasa. Esto concuerda con reportes previos para aislamientos clínicos de *T. asahii*,<sup>41,48</sup> aunque un estudio reciente ha reportado la actividad fosfolipasa para seis de 18 aislamientos clínicos<sup>115</sup>. Además, este tipo de actividad lítica se ha demostrado en cepas de *Trichosporon* aisladas de leche bovina<sup>117</sup> y de las heces y cloaca de aves silvestres<sup>118</sup>.

Las hemolisinas son toxinas que forman poros en las membranas de eritrocitos liberando el hierro necesario como factor de crecimiento para varios hongos<sup>119</sup>. Se ha observado una actividad hemolítica variable en aislamientos de *T. asahii* genotipo I, III y IV<sup>41</sup>. Esto contrasta con nuestros resultados en que no se encontró actividad hemolítica en ninguno de nuestros aislamientos pertenecientes a dichos genotipos. Sólo un aislamiento perteneciente a *T. asahii* genotipo VII produjo hidrólisis en agar con sangre.

En relación a las aspartil-proteasas, su papel como factor de virulencia se ha descrito ampliamente en *C. albicans*,<sup>120</sup> donde se ha demostrado que participan en la degradación de proteínas de humanos, adherencia a diferentes tejidos y tipos celulares y la regulación del cambio fenotípico. ASB se ha empleado rutinariamente para la evaluación de la producción de proteasas por *Candida* spp., y se ha usado para la evaluación de esta actividad por *T. asahii*, *T. cutaneum* y *T. japonicum*<sup>41,48,121</sup>. Sólo un estudio ha reportado la actividad positiva de aspartil-proteasas en 12 de 18 aislamientos clínicos de *T. asahii*<sup>15</sup>. Nuestros hallazgos mostraron que el 23% de los aislamientos de esta especie tuvieron actividad fuerte o muy fuerte contra ASB. Todos excepto uno de dichos aislamientos fueron obtenidos de muestras de orina.

Las esterasas hidrolizan enlaces éster para la liberación de ácidos grasos y, a diferencia de otras lipasas, son capaces de actuar sobre sustratos solubles<sup>122</sup>. Todos nuestros aislamientos fueron positivos para actividad esterasa al emplear Tween 80 como sustrato. La producción extracelular de estos compuestos líticos se ha estudiado previamente en *T. japonicum*, *T. montevidense* y *T. asahii* empleando el mismo sustrato. Con la excepción de una cepa de *T. montevidense* aislada de carne de llama, todos los aislamientos han resultado positivos para este tipo de actividad lítica<sup>48,123,124</sup>. Es significativo que todos los estudios donde se evalúan aislamientos clínicos han reportado actividad positiva, lo que sugiere un papel para las esterasas durante la patogenia de *Trichosporon*.

La producción de biopelículas se ha asociado a una alta mortalidad en infecciones sistémicas por *Candida* spp<sup>125,126</sup>. Esta relación ha incrementado el

interés en comprender el posible papel de las biopelículas en la patogenia de otros hongos. Aún y cuando la capacidad de producir biopelículas de *Trichosporon* está reportada, diferencias *in vitro* sugieren una variabilidad en esta producción que pudiera estar relacionada al sitio de aislamiento, tiempo de fase de adhesión o características intrínsecas de las cepas, como especie o genotipo.

La producción de biopelículas por *Trichosporon*, principalmente *T. asahii*, ha sido comparativamente evaluada empleando diferentes materiales de soporte,<sup>127</sup> tiempos de incubación para la fase de crecimiento,<sup>128</sup> temperaturas y valores de pH<sup>129</sup>. Un grupo comparó diferentes fases de adhesión de 60, 90 y 120 min, reportando que los tiempos de incubación de 90 min ofrecían los resultados más reproducibles<sup>128</sup>. En nuestro estudio, no observamos lecturas de absorbancia relevantes en los ensayos con CV al evaluar tiempos de fase de adhesión de 2 h. Decidimos ampliar nuestro análisis para incluir periodos de incubación más largos para esta fase. Esto adquiere relevancia ya que observamos una producción de biopelícula significativamente mayor al incrementar el tiempo de incubación de la fase de adhesión de 2 a 4 h. Estos resultados pudieran relacionarse a un mayor tiempo de exposición de *Trichosporon* a superficies adecuadas en el ámbito clínico, y traducirse en una virulencia elevada o persistencia de la infección.

Aún y cuando todos nuestros aislamientos produjeron biopelícula, sólo el 35.29% fueron capaces de producir biopelículas robustas comparables a aquellas producidas por la cepa de *C. albicans* incluida en este estudio como control. Esto contrasta con el trabajo de Dağ and Cerikçioğlu y Araújo de Almeida

y cols., cuyos aislamientos clínicos de *T. asahii* fueron clasificados como no productores o productores moderados<sup>48,130</sup>.

Iturrieta-González y cols., analizaron la producción de biopelículas de diversos aislamientos clínicos de *Trichosporon* sp., encontrando que el 66.67% de sus aislamientos de *T. asahii* obtuvieron lecturas de absorbancia  $\geq 1.0$  para CV, en comparación del 20.51% de nuestros aislamientos. En el mismo estudio, los dos aislamientos de *T. dermatis* evaluados tuvieron también absorbancias  $\geq 1.0$ , mientras que sólo uno de nuestros dos aislamientos de la misma especie tuvo resultados similares. Del resto de las especies evaluadas, el 93.75% de los aislamientos mostró absorbancias  $\geq 1.0$ . Dicho estudio, sin embargo, cuantificó la formación de biopelículas empleando fases de crecimiento de 48 h de incubación, mientras que nosotros usamos biopelículas de 72 h, como se describe en nuestros métodos. Los autores discuten que al comparar ambos puntos de lectura, las biopelículas de 72 h mostraron menores valores de absorbancia que las biopelículas de 48 h, lo que ellos adjudican a un desprendimiento de la biopelícula de la superficie de poliestireno<sup>128</sup>. De manera similar, de Aguiar Cordeiro y cols. realizaron un estudio sobre la cinética de crecimiento de biopelículas para aislamientos clínicos de *T. inkin*, donde reportan que se detectó una producción máxima de biopelícula a las 48 h de crecimiento<sup>131</sup>.

Di Bonaventura y cols. y Sun y cols. han reportado la formación de biopelículas por *T. asahii*; sin embargo, ambos grupos emplearon el método de reducción XTT para la cuantificación<sup>41,50</sup>. El método XTT generalmente produce valores de absorbancia menores que aquellos obtenidos con el método CV, lo que impide

una comparación de resultados adecuada. Aún y cuando el uso de tinción con CV ha demostrado ser un método confiable para la cuantificación de biopelículas en bacterias y levaduras,<sup>76,132,133</sup> el análisis de biopelículas en relación a *Trichosporon* sp. ha visto la aplicación de diferentes protocolos o modificaciones a éstos. Es necesaria la estandarización de un método de cuantificación de biopelículas para la comparación y contraste de resultados apropiados entre los diferentes grupos de investigación.

Aún no se ha determinado si la formación de biopelícula está asociada a la especie, genotipo o lugar de aislamiento. Sun y cols. analizaron *T. asahii* genotipos I, III y IV y encontraron una producción significativamente mayor en aislamientos de genotipo III y IV al compararlos con las biopelículas producidas por *T. asahii* genotipo I<sup>41</sup>. Esto contrasta con los resultados de Iturrieta-González y cols., que no encontraron diferencia en la producción de biopelículas para los cuatro genotipos analizados (I, III, IV y V). Nosotros no observamos una correlación entre la producción de biopelícula y el genotipo de *T. asahii*. Sin embargo, fue posible encontrar una asociación entre muy fuertes productores de biopelícula y los aislamientos de TSNI. El mismo grupo reportó una asociación entre una alta producción de biopelícula y aquellos aislamientos de *Trichosporon* aislados de infecciones superficiales. De manera similar, nosotros encontramos una relación entre los productores de biopelícula muy fuertes y aislamientos de pelo.

Otro aspecto importante en el escenario clínico es la resistencia contra los antifúngicos más comúnmente usados. Es aceptado que el género *Trichosporon*

no es inhibido por AMB, y nuestros resultados muestran que el 44% de nuestros aislamientos tuvieron CMI  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  para este antifúngico. Resultados similares han sido reportados por otros autores<sup>54,102,104</sup>. A la fecha, solo un estudio ha reportado una inhibición por AMB en el 100% de 18 aislamientos de *T. asahii*<sup>84</sup>.

Respecto a las equinocandinas, la falta de actividad contra *Trichosporon* spp. ha sido previamente reportada<sup>134</sup>. Encontramos CMI  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  en todos nuestros aislamientos en concordancia con lo encontrado previamente para *T. asahii*, *T. inkin* y *T. faecale*<sup>87,88,131</sup>. Guo y cols. y Chagas-Neto y cols. han reportado CMI de 2  $\mu\text{g/ml}$  para CAS, que es el punto de corte de *C. albicans* para este compuesto<sup>54,55</sup>.

Los compuestos triazólicos fueron los más efectivos *in vitro* contra *Trichosporon*. Reportes previos establecen CMI bajas para VRC y FLC<sup>54,55,84,102,104</sup>. Nuestros resultados muestran una excelente actividad contra aislamientos de *Trichosporon*, con CMI<sub>90</sub> de 0.06  $\mu\text{g/ml}$  para VRC y CMI<sub>90</sub> de 0.5-2  $\mu\text{g/ml}$  para FLC. Dos estudios adicionales han evaluado la eficiencia de PSC contra aislamientos clínicos de *T. asahii* con resultados variables. Mientras que Araujo Ribeiro y cols. reportaron un amplio rango de CMI de 0.12-16  $\mu\text{g/ml}$ ,<sup>88</sup> Taverna y cols. reportaron un estrecho rango de CMI 0.015-2  $\mu\text{g/ml}$  para diferentes aislamientos de *Trichosporon* sp, incluyendo *T. asahii* y *T. dermatis*<sup>105</sup>. De manera similar al reporte de Taverna y cols., nosotros obtuvimos un estrecho rango de CMI bajas (0.03-0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) para todos los aislamientos evaluados.

Respecto a 5FC, y al igual que en reportes previos, se ha observado una respuesta variable ante este antifúngico<sup>54,84,88,104</sup>.

Al evaluar la susceptibilidad de células embebidas en biopelículas, observamos que todos los aislamientos aumentaron su resistencia contra AMB y FLC. En general, la eficiencia *in vitro* fue por lo menos 4 veces menor para AMB y 256 veces menor para FLC. Observamos además una tendencia de mayor resistencia a antifúngicos asociada a una mayor producción de biopelículas. De manera similar, estudios previos han reportado que los fuertes productores de biopelículas requirieron mayores CMI's para AMB y FLC (>1024 µg/ml) comparado con las necesarias para inhibir a los débiles formadores de biopelícula (128-512 µg/ml)<sup>41</sup>. Sin embargo, existe un reporte contradictorio en que no se logró establecer una asociación entre la producción de biopelícula y la resistencia contra AMB y triazoles<sup>128</sup>.

Para evaluar si existe diferencia en la virulencia de diversas cepas de *T. asahii*, se realizó un modelo murino de tricosporonosis empleando tres aislamientos elegidos en base a su perfil *in vitro* de factores de virulencia.

Existen reportes de modelos murinos experimentales de tricosporonosis diseminada, pero estos se han enfocado en la eficiencia terapéutica de compuestos antifúngicos<sup>135-138</sup> o la patogenicidad en animales inmunosuprimidos<sup>42,57,139</sup>. Gokaslan y Anaissie incluyeron ratones CF1 inmunocompetentes en su modelo murino de tricosporonosis diseminada con *T. beigelii*. Sus hallazgos en relación a la patogenicidad son similares a los nuestros,

en que una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC/ratón produjeron 100% de sobrevivencia al día 30 post-infección, con una mayor carga fúngica en riñón comparado con bazo e hígado; sin embargo, ellos reportaron una eliminación total del hongo en estos dos últimos órganos al día 7, mientras que nosotros observamos una ligera persistencia en algunos ratones a lo largo de nuestro modelo experimental, aunque con bajas cuentas de UFC. De manera similar, ellos reportaron un decremento de la carga fúngica en riñón al día 7<sup>56</sup>. En general, estos resultados indican que las infecciones por *T. asahii* en ratones inmunocompetentes son resueltas alrededor del día 7 post-infección.

Se observó una mayor producción de G-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 al día 1 post-infección para las cepas evaluadas. Estos resultados concuerda con los de carga fúngica donde se observó una alta producción de dichas citocinas al día 1 cuando la carga fúngica también se encontró en sus niveles más elevados, disminuyendo al día 7 post-infección. G-CSF está involucrado en el reclutamiento de células polimorfonucleares durante las infecciones. Previamente, se ha reportado en base a ensayos *in vitro* y modelos de eficiencia terapéutica que la adición de CSFs tiene un efecto anti-*Trichosporon*<sup>62-64,140</sup>. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 son citocinas pro-inflamatorias involucradas en la activación de mecanismos microbicidas, como producción de óxido nítrico sintasa inducible, estallido respiratorio y proteínas de la fase aguda<sup>61,141</sup>. El aumento de dichas citocinas en nuestro modelo sugiere que la activación de los mecanismos microbicidas es suficiente para el control de la infección fúngica. No se observó aumento en la producción de IL-4 o IL-2, citocinas relacionadas a la respuesta inmune adquirida, ni de IL-

10 e IL-17A. Lo anterior nos sugiere que la activación de la respuesta inmune innata fue suficiente para el control de la infección en nuestro modelo de infección en ratones inmunocompetentes.

La tinción con hematoxilina y eosina nos permitió observar poco infiltrado de células polimorfonucleares en los tres órganos evaluados. La presencia de éstas células se relaciona con la alta producción de G-CSF. Se realizó la tinción Grocott-Gomori para la detección del hongo en tejido. Se observaron escasas artroconidias y estructuras hifales, lo que concuerda con los bajos conteos de UFC obtenidos en las pruebas de carga fúngica. En base a el análisis histopatológico, no se observaron diferencias importantes entre las tres cepas o los tres días evaluados.

Recientemente, Mariné y cols. desarrollaron un modelo murino comparando tres diferentes cepas de *T. asahii* en ratones inmunocomprometidos, pero no encontraron diferencia en la virulencia basado en carga fúngica y hallazgos histopatológicos. Su estudio, sin embargo, no declara la razón por la que esas tres cepas en particular fueron elegidas, o si existe alguna diferencia fenotípica entre ellas<sup>142</sup>. De manera similar y en base a nuestros resultados, no logramos detectar una diferencia en la patogenicidad de los tres aislamientos clínicos de *T. asahii* elegidos para nuestro modelo experimental.

## CAPÍTULO 8

### CONCLUSIONES

- *T. asahii* genotipo I es el genotipo más predominante en este estudio.
- *T. asahii* produjo aspartil-proteasas. *T. asahii*, *T. dermatis* y TSN1 produjeron ADNasa y biopelícula.
- La producción de biopelículas estuvo asociada al aumento de la resistencia contra antifúngicos.
- El perfil de citocinas en suero evidenciaron que la respuesta inmune innata es suficiente para el control de la tricosporonosis.
- No se observó una correlación entre la caracterización fenotípica y molecular y la virulencia de diversos aislamientos clínicos de *Trichosporon*.

## REFERENCIAS

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4419-4431.
2. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a perspective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39:309-317.
3. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis*. 2002;35:627-630.
4. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1319-1324.
5. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2002;34:909-917.
6. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2001;32:358-366.
7. Wilson LS, Reyes CM, Stolpman M, Speckman J, Allen K, Beney J. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Heal*. 2002;5:26-34.
8. Zaoutis TE, Argon J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1232-1239.
9. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis*. 1997;24:1122-1128.
10. Kauffman CA. Fungal infections in older adults. *Clin Infect Dis*. 2001;33:550-555.
11. Kaufman D, Fairchild KD. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:638-680.
12. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis*. 2006;43(Suppl 1):S3-S14.
13. 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(4):289-316.
14. Behrend G. Ueber trichomycosis nodosa (Juhel-Rénoy): Piedra (Osorio). *Klin Wschr*. 1890;27:464-467.
  15. Guého E, de Hoog GS, Smith MT. Neotypification of the genus *Trichosporon*. *Ant Leeuw*. 1992;61(4):285-288.
  16. Guého E, Tredick J, Phaff HJ. DNA base composition and DNA relatedness among species of *Trichosporon* Behrend. *Ant Leeuw*. 1984;50:17-32.
  17. Guého E, Kurtzman CP, Peterson SW. Evolutionary affinities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S ribosomal RNA sequence divergence. *Syst Appl Microbiol*. 1989;12:230-236.
  18. Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):682-700.
  19. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. Vol 4ta ed. México, DF: McGraw Hill/Interamericana; 2012.
  20. Lee JW, Melcher GA, Rinaldi MG, Pizzo PA, Walsh TJ. Patterns of morphologic variation among isolates of *Trichosporon beigelii*. *J Clin Microbiol*. 1990;28(12):2823-2827.
  21. Guého E, Improvisi L, de Hoog GS, Dupont B. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses*. 1994;37:3-10.
  22. Romero Navarrete M, Castillo Solana A, Arenas Guzmán R, Fernández Martínez R. Piedra blanca. Revisión de los casos mexicanos y estudio de prevalencia y factores de riesgo de cien pacientes atendidas en la consulta externa de dermatología del Hospital General de Acapulco, Guerrero. *Dermatología Rev Mex*. 2011;55(1):3-8.
  23. Kiken DA, Sekaran A, Antaya RJ, Davis A, Imaeda S, Silverberg NB. White piedra in children. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(6):956-961.
  24. Da Silva Pontes ZBV, Ramos AL, De Oliveira Lima E, De Lacerda Guerra MDF, Oliveira NMC, Dos Santos JP. Clinical and mycological study of scalp white piedra in the State of Paraíba, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(5):747-750.
  25. Kalter DC, Tschen JA, Cernoch PL, et al. Genital white piedra: epidemiology, microbiology, and therapy. *J Am Acad Dermatol*. 1986;14(6):982-993.
  26. Schwinn A, Ebert J, Hamm H, Bröcker E-B. Genitale weisse Piedra. *Hautarzt*. 1996;47(8):638-641.
  27. Shivaprakash MR, Singh G, Gupta P, Dhaliwal M, Kanwar AJ, Chakrabarti A. Extensive white piedra of the scalp caused by *Trichosporon inkin*: a case report and review of literature. *Mycopathologia*. 2011;172:481-486.
  28. Dhib I, Fathallah A, Yaacoub A, Zemni R, Gaha R, Said MB. Clinical and

- mycological features of onychomycosis in central Tunisia: a 22 years retrospective study (1986-2007). *Mycoses*. 2013;56(3):273-280.
29. Pontes ZB, Lima Ede O, Oliveira NM, Dos Santos JP, Ramos AL, Carvalho MF. Onychomycosis in João Pessoa City, Brazil. *Rev Argent Microbiol*. 2002;34(2):95-99.
  30. Kim ES, Kim DH, Chang SE, et al. *Trichosporon* species in onychomycosis and tinea pedis. *Korean J Dermatol*. 2003;41(6):702-707.
  31. 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(4):299-302.
  32. Watson KC, Kallichurum S. Brain abscess due to *Trichosporon cutaneum*. *J Med Microbiol*. 1970;3(1):191-193.
  33. Ruan S-Y, Chien J-Y, Hsueh P-R. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 2009;49(1):e11-e17.
  34. Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, et al. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2011;43(3):176-185.
  35. Dotis J, Pana ZD, Roilides E. Non-*Aspergillus* fungal infections in chronic granulomatous disease. *Mycoses*. 2013;56(4):449-462.
  36. Oberoi JK, Wattal C, Goel N, Raveendran R, Datta S, Prasad K. Non-*albicans* *Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. *Indian J Med Res*. 2012;136(6):997-1003.
  37. Alangaden GJ. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infect Dis Clin N Am*. 2011;25(1):201-225.
  38. Kontoyiannis DP, Torres HA, Chagua M, et al. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. *Scand J Infect Dis*. 2004;36(8):564-569.
  39. Girmenia C, Pagano L, Martino B, et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1818-1828.
  40. Suzuki K, Nakase K, Kyo T, et al. Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Eur J Haematol*. 2010;84(5):441-447.
  41. Sun W, Su J, Xu S, Yan D. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. *J Med Microbiol*. 2012;61:1750-1757.
  42. Yamagata E, Kamberi P, Yamakami Y, Hashimoto A, Nasu M. Experimental

- model of progressive disseminated trichosporonosis in mice with latent trichosporonemia. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3260-3266.
43. Heslop OD, Nyi Nyi M-P, Abbott SP, Rainford LE, Castle DM, Coard KCM. Disseminated trichosporonosis in a burn patient: meningitis and cerebral abscess due to *Trichosporon asahii*. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4405-4408.
  44. Matsue K, Uryu H, Koseki M, Asada N, Takeuchi M. Breakthrough trichosporonosis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin. *Clin Infect Dis.* 2006;42(6):753-757.
  45. Rastogi VL, Nirwan PS. Invasive trichosporonosis due to *Trichosporon asahii* in a non-immunocompromised host: a rare case report. *Indian J Med Microbiol.* 2007;25(1):59-61.
  46. Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1826-1830.
  47. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2005;48(6):365-377.
  48. Dağ A, Cerikçioğlu N. [Investigation of some virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from the clinical samples of hospitalized patients]. *Mikrobiyol Bült.* 2006;40(3):225-235.
  49. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):95-108.
  50. Di Bonaventura G, Pompilio A, Picciani C, Iezzi M, D'Antonio D, Piccolomini R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(10):3269-3276.
  51. Walsh TJ, Melcher GP, Rinaldi MG, et al. *Trichosporon beigellii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1616-1622.
  52. Rodriguez-Tudela JL, Diaz-Guerra TM, Mellado E, et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4026-4034.
  53. Li H-M, Du H-T, Liu W, Wan Z, Li R-Y. Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon* species. *Mycopathologia.* 2005;160:217-225.
  54. Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo ASA, Colombo AL. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2009;47(4):1074-1081.
  55. Guo L-N, Xiao M, Kong F, et al. Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3805-3811.
  56. Gokaslan A, Anaissie E. A novel murine model of disseminated trichosporonosis.

- Infect Immun.* 1992;60(8):3339-3344.
57. Hospenthal D, Belay T, Lappin P, Rogers A, Kennedy M. Disseminated trichosporonosis in a neutropenic murine model. *Mycopathologia.* 1993;122(2):115-122.
  58. Yamagata E, Kamberi P, Yamakami Y, Hashimoto a., Nasu M. Experimental model of progressive disseminated trichosporonosis in mice with latent trichosporonemia. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3260-3266.
  59. Lin Y-P, Yang Y-P, Huang W-M, Chen Y-H, Li S-F, Fan Y-M. Experimental pathogenicity of a clinical isolate of *Trichosporon dermatis* in a murine model. *Mycopathologia.* 2011;172(5):381-387.
  60. Lacy SH, Gardner DJ, Olson LC, Ding L, Holland SM, Bryant MA. Disseminated trichosporonosis in a murine model of chronic granulomatous disease. *Comp Med.* 2003;53(3):303-308.
  61. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System.* Vol 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2012.
  62. Muranaka H, Suga M, Nakagawa K, Sato K, Gushima Y, Ando M. Effects of granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in a neutropenic murine model of trichosporonosis. *Infect Immun.* 1997;65(8):3422-3429.
  63. Sasaki E, Tashiro T, Kuroki M, et al. Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on anti-fungal activity of mononuclear phagocytes against *Trichosporon asahii*. *Clin Exp Immunol.* 2000;119(2):293-298.
  64. Lyman CA, Garrett KF, Pizzo PA, Walsh TJ. Response of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes to *Trichosporon beigellii*: host defense against an emerging opportunistic pathogen. *J Infect Dis.* 1994;170:1557-1565.
  65. de Hoog GS, Cuarro GJ, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi.* Vol 2 ed. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000.
  66. Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol.* 1946;52:461-466.
  67. BioMérieux. API 20 C AUX. 2007.
  68. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
  69. Richini-Pereira VB, Pires de Camargo RM, Bagagli E, Marques SA. White piedra: molecular identification of *Trichosporon inkin* in members of the same family. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(3):402-404.
  70. Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: *The Yeasts, a Taxonomic Study, 4.* Vol ; 1998:77-100.

71. Luo G, Samaranayake LP, Yau JYY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol.* 2001;39(8):2971-2974.
72. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982;20:7-14.
73. Chakrabarti A, Nayak N, Talwar P. *In vitro* proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia.* 1991;114(3):163-168.
74. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2000;38(12):4626-4628.
75. Tosun I, Akyuz Z, Guler NC, et al. Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Med Mycol.* 2013;51(5):483-492.
76. Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol.* 2011;49(3):253-262.
77. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts M27-A3; Approved Standard - Third Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
78. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts M27-S4; Fourth Informational Supplement.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
79. *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado Y Uso de Los Animales de Laboratorio.*; 1999.
80. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Vol 8th ed. Washington, DC: National Academies Press; 2011.
81. 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(12):1428-1431.
82. Lee WS, Chang SE, Kim DH, et al. A case of toenail onychomycosis caused by *Trichosporon asahii*. *Korean J Dermatol.* 2002;40(8):980-982.
83. Xia Z, Yang R, Wang W, Cong L. Genotyping and antifungal drug susceptibility of *Trichosporon asahii* isolated from Chinese patients. *Mycopathologia.* 2012;173(2-3):127-133.
84. Rodriguez-Tudela JL, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Bernal-Martinez L, Cuenca-Estrella M. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;58(4):435-440.
85. Zhu H, Wang W-L, Li H-T, Ao J-H, Yang R-Y. *In vitro* conditions for budded-to-hyphal-form transition of *Trichosporon asahii* of different sources. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6(1):81-86.

86. Sugita T, Ichikawa T, Matsukura M, et al. Genetic diversity and biochemical characteristics of *Trichosporon asahii* isolated from clinical specimens, houses of patients with Summer-type-hypersensitivity pneumonitis, and environmental materials. *J Clin Microbiol.* 2001;39(7):2405-2411.
87. Taj-Aldeen SJ, Al-Ansari N, El Shafei S, et al. Molecular identification and susceptibility of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Qatar: isolation of *Trichosporon dohaense* Taj-Aldeen, Meis & Boekhout sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1791-1799.
88. Araujo Ribeiro M, Alastruey-Izquierdo A, Gomez-Lopez A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Molecular identification and susceptibility testing of *Trichosporon* isolates from a Brazilian hospital. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:221-225.
89. Gunn SR, Reveles XT, Hamlington JD, Sadkowski LC, Johnson-PAis TL, Jorgensen JH. Use of DNA sequencing analysis to confirm fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a pediatric patient. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1175-1177.
90. Hashino S, Takahashi S, Morita R, et al. Fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a patient with refractory Burkitt's leukemia. *Blood Res.* 2013;48(2):154-156.
91. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:288-305.
92. Summerbell RC. *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton*, and Agents of Superficial Mycoses. In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011:1919-1942.
93. Fenn JP, Segal H, Barland B, et al. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J Clin Microbiol.* 1994;32(5):1184-1187.
94. Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, Pincus D, Pollack J, Marler J. Comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):883-886.
95. Land GA, Harrison BA, Hulme KL, Cooper BH, Byrd JC. Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. *J Clin Microbiol.* 1979;10(3):357-364.
96. Smith MB, Dunklee D, Vu H, Woods GL. Comparative performance of the RapID Yeast Plus system and the API 20C AUX Clinical Yeast system. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2697-2699.
97. Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, Salkin IF, Chaturvedi V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 1998;36(11):3396-3398.

98. Land GA, Salkin IF, el-Zaatari M, McGinnis MR, Hashem G. Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme-based yeast identification system. *J Clin Microbiol.* 1991;29(4):718-722.
99. Wolf DG, Falk R, Hacham M, et al. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4420-4425.
100. Ağirbasli H, Bilgen H, Özcan SK, et al. Two possible cases of *Trichosporon* infections in bone-marrow-transplanted children: the first case of *T. japonicum* isolated from clinical specimens. *Jpn J Infect Dis.* 2008;61(2):130-132.
101. Rastogi V, Honnavar P, Rudramurthy SM, Pamidi U, Ghosh A, Chakrabarti A. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Trichosporon* isolates in India. *Mycoses.* 2016;myc.12511.
102. Kalkanci A, Sugita T, Arikan S, et al. Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients. *Med Mycol.* 2010;48(1):141-146.
103. Yang Y-L, Liu Y-W, Chen H-T, Tsai M-S, Chu W-L, Lo H-J. Genotype analysis based on intergenic spacer 1 sequences of *Trichosporon asahii* collected in Taiwan. *Med Mycol.* 2013;51(8):880-883.
104. Mekha N, Sugita T, Ikeda R, et al. Genotyping and antifungal drug susceptibility of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii* isolated from Thai patients. *Mycopathologia.* 2010;169:67-70.
105. Taverna CG, Córdoba S, Murisengo OA, Vivot W, Davel G, Bosco-Borgeat ME. Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. *Med Mycol.* 2014;52(4):356-366.
106. Khan MSA, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M, Musarrat J. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. In: Ahmad I, Owais M, Shahid M, Aqil F, eds. *Combating Fungal Infections*. Vol Berlin: Springer-Verlag; 2010:21-45.
107. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4(2):119-128.
108. Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* Species. In: Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM, eds. *Advances in Applied Microbiology, Vol. 67*. Vol Burlington: Academic Press; 2009:131-190.
109. Abad A, Fernández-Molina J V, Bikandi J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 2010;27(4):155-182.
110. Silva Lopes MF, Simoes AP, Tenreiro R, Figueiredo Marques JJ, Barreto Crespo MT. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol.* 2006;112:208-214.
111. Sugita T, Takashima M, Nakase T, Ichikawa T, Ikeda R, Shinoda T. Two new

- yeasts, *Trichosporon debeurmannianum* sp. nov. and *Trichosporon dermatitis* sp. nov., transferred from the *Cryptococcus humicola* complex. *Int J Syst Evol Micr.* 2001;51:1221-1228.
112. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Env Microbiol.* 2010;12:1621-1629.
  113. Mann EE, Rice KC, Boles BR, et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One.* 2009;4:e5822.
  114. Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Kockritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun.* 2010;2:576-586.
  115. Bentubo HDL, Gompertz OF. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. *Springerplus.* 2014;3:377-386.
  116. Pugh D, Cawson RA. The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia.* 1977;15:44-51.
  117. Melville PA, Benites NR, Ruz-Peres M, Yokoya E. Proteinase and phospholipase activities and development at different temperatures of yeasts isolated from bovine milk. *J Dairy Res.* 2011;78(4):385-390.
  118. Cafarchia C, Romito D, Coccioli C, Camarda A, Otranto D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. *Med Mycol.* 2008;46(5):429-434.
  119. Nayak AP, Green BJ, Beezhold DH. Fungal hemolysins. *Med Mycol.* 2013;51(1):1-16.
  120. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):400-428.
  121. Groninger HS, Eklund MW. Characteristics of a proteinase of a *Trichosporon* species isolated from Dungeness crab meat. *Appl Env Microbiol.* 1966;14(1):110-114.
  122. Anthonsen HW, Baptista A, Drabløs F, et al. Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. *Biotechnol Annu Rev.* 1995;1:315-371.
  123. Chanda S, Ghosh K, Sarkar S, Majumdar P, Barik S. Monitoring lipase and protease producing microbes along the sugarcane growing alluvial soil tracts of West Bengal, India: an ecological investigation. *J Mycopathol Res.* 2006;44(2):201-210.
  124. Mendoza LM, Padilla B, Belloch C, Vignolo G. Diversity and enzymatic profile of yeasts isolated from traditional llama meat sausages from north-western Andean region of Argentina. *Food Res Int.* 2014;62:572-579.

125. Tumbarello M, Fiori B, Trecarichi EM, et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PLoS One*. 2012;7(3):1-9.
126. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000828.
127. Ren X-P, Fan X, Yang R-Y, Xia Z-K, Li H-T. Biofilm formation of *Trichosporon asahii* on different support materials. *Chin J Mycol*. 2010;4:004.
128. Iturrieta-González IA, Padovan ACB, Bizerra FC, Hahn RC, Colombo AL. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PLoS One*. 2014;9(10):e109553.
129. Fan X, Ren XP, Li HT. Research on biofilm formation of *Trichosporon asahii* on different temperature and pH value. *Chin J Lab Diagn*. 2011;5:002.
130. Araújo de Almeida A, do Amaral Crispim B, Barufatti Grisolia A, Estivalet Svidzinski TI, Gonçalves Ortolani L, Pires de Oliveira KM. Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. *Rev Argent Microbiol*. 2016;48(1):62-66.
131. de Aguiar Cordeiro R, Serpa R, Uchoa Alexandre CF, et al. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. *J Med Microbiol*. 2015;64:1277-1286.
132. Burton E, Yakandawala N, LoVetri K, Madhyastha MS. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biot*. 2007;34(1):1-4.
133. Nunes JM, Bizerra FC, Ferreira RC, Colombo AL. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:382-389.
134. Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008;46(1):120-128.
135. Tokimatsu I, Kushima H, Hashinaga K, et al. The prophylactic effectiveness of various antifungal agents against the progression of trichosporonosis fungemia to disseminated disease in a neutropenic mouse model. *Clin Exp Dermatol*. 2007;29(1):84-88.
136. Serena C, Pastor FJ, Gilgado F, Mayayo E, Guarro J. Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):497-502.
137. Treviño-Rangel RJ, López L, Palma-Nicolás JP, Hernández-Bello R, González JG, González GM. Therapeutic efficacy of posaconazole in a murine model of disseminated trichosporonosis. *J Antimicrob Chemoth*. 2014;69:1075-1078.
138. Sasai D, Okubo Y, Ishiwatari T, et al. Histopathological evaluation of the efficacy of antifungals for experimental *Trichosporon* bloodstream infection. *Jpn J Infect*

*Dis.* 2013;66:133-139.

139. Yang R-Y, Wang W-L, Ao J-H, Hao Z-F, Zhang J, Wang C-M. Pathogenicity of *Trichosporon asahii* in a murine model of disseminated trichosporonosis. *Chin Med J.* 2008;121(24):2557-2560.
140. Richardson MD, Chung I. GM-CSF-modulated phagocytosis of *Trichosporon beigelii* by human neutrophils. *J Med Microbiol.* 1997;46(4):321-325.
141. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-189.
142. Mariné M, Bom VLP, Alves de Castro P, et al. The development of animal infection models and antifungal efficacy assays against clinical isolates of *Trichosporon asahii*, *T. asteroides* and *T. inkin*. *Virulence.* 2015;6(5):476-486.