



Universidad de Costa Rica

Sede Rodrigo Facio

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de
Licenciatura en Microbiología y Química Clínica

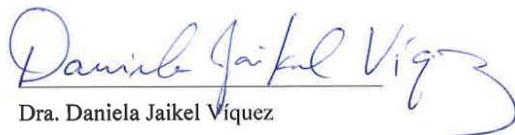
Determinación de los patrones de susceptibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de
Trichosporon frente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol y voriconazol

Kendall Josué Alvarado Molina

B80340

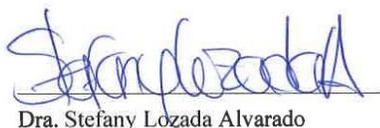
Julio, 2023

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:



Dra. Daniela Jaikel Víquez

Tutora



Dra. Stefany Lozada Alvarado

Lectora



Dra. Ingrid Salas Campos

Dra. Ingrid Salas Campos

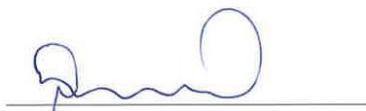
Lectora



Dr. David Loria Masis

Dr. David Loria Masis

Presidente del Tribunal



Dr. César Rodríguez Sánchez

Dr. César Rodríguez Sánchez

Profesor designado

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mis padres, Isidora y Wilson, y a mi hermano Sebastián. Las tres personas que siempre van a estar para apoyarme y las únicas tres en quien tengo absoluta confianza. Especialmente a mis papás, por brindarme el apoyo económico y emocional que representa estudiar fuera del hogar durante varios años. Y nuevamente a Sebas, porque sus chistes malos, sus risas malvadas y sus bromas de hermano menor le aportaron felicidad a mis días durante los momentos más retadores de la universidad.

Le agradezco a mis compañeros, amigos y futuros colegas, Guillermo, Rodney y Ana. De verdad, sin ustedes no hubiera podido lograrlo. Fueron mi grupo de apoyo, mi grupo de estudio y mi grupo de amigos durante toda la carrera. Hicieron que el vivir en San José y el estar en la universidad fueran experiencias inolvidables, las cuales recordaré para siempre ¡De verdad, muchas gracias a los tres!

Además, agradezco a los docentes de la Facultad de Microbiología, porque me permitieron adquirir las destrezas técnicas y conocimientos básicos que usaré durante toda mi vida profesional como futuro microbiólogo, y además, me inculcaron los principios básicos que hacen a un buen profesional: la aspiración al conocimiento, el escepticismo, la ética, la humildad y el respeto.

Le agradezco profundamente a las personas funcionarias de la Sección de Micología Médica, especialmente a la Dra. Daniela Jaikel, a la Dra. Stefany Lozada, a la Dra. Ingrid Salas y a la Ing. Alejandra Gómez, porque me permitieron desarrollar mi trabajo final de graduación y me brindaron su calidez humana. Muchas gracias por hacer que las horas dentro del laboratorio, y todo el tiempo dedicado a este proyecto, fueran momentos agradables y de muchísimo aprendizaje académico.

Índice de contenidos

Agradecimientos	3
Índice de contenidos	4
Índice de figuras	6
Índice de cuadros	7
Índice de abreviaturas	8
Justificación	9
Hipótesis	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Marco teórico.....	11
Historia	11
Clasificación taxonómica	13
Distribución geográfica y anatómica.....	14
Modo de transmisión	15
Manifestaciones clínicas e incidencia.....	17
Piedra blanca.....	17
Onicomycosis	18
Micosis invasiva por <i>Trichosporon</i>	20
Otras micosis causadas por <i>Trichosporon</i>	22
Patogénesis	22
Pronóstico y complicaciones	24
Diagnóstico de laboratorio.....	24
Examen directo	24
Cultivo	26

Urea	28
Métodos comerciales automatizados y semiautomatizados	28
Métodos no rutinarios y reacciones cruzadas	30
Diagnóstico diferencial.....	32
Tratamiento.....	33
Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos	36
Metodología.....	39
Resultados.....	41
Identificación bioquímica y proteómica.....	41
Distribución anatómica.....	42
Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos (PSA)	42
Discusión	44
Identificación bioquímica y proteómica.....	44
Distribución anatómica.....	45
Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos (PSA)	46
Conclusiones.....	51
Referencias	52
Anexos.....	69

Índice de figuras

Figura 1. Nódulos hialinos de piedra blanca en cabello oscuro (a) y castaño (b) (algunos están señalados con flechas azules) (Tomado de Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019).	17
Figura 2. Fase parasitaria de la piedra blanca. Observación microscópica directa de las estructuras parasitarias (micelio hialino con artrosporas y blastosporas) en la hebra de un cabello infectado con <i>Trichosporon</i> spp., previamente tratado con hidróxido de potasio (KOH). A) 10X B) 40X. (Tomado de Bonifaz Trujillo, 2020).	25
Figura 3. Observación microscópica directa de una expectoración donde se observa micelio con artrosporas y blastosporas de <i>Trichosporon</i> (Tinción Gram, aumento 100X) (Tomado de Bonifaz Trujillo, 2020).	26
Figura 4. Cultivo de <i>Trichosporon</i> a) a partir de una piedra blanca (Recuperado de Ellis y Kidd, 2021) b) en un cultivo puro (Tomado de Gross y Salas, 2012).	27
Figura 5. Apresorio de <i>T. inkin</i> cultivado durante tres días en agar harina de maíz (Tomado de Shivaprakash et al., 2011).	27
Figura 6. Estructura química de los antifúngicos analizados en este trabajo (Tomado de Bonifaz Trujillo, 2020)	34

Índice de cuadros

Cuadro 1. Comparación de métodos de microdilución en caldo utilizados para el estudio de la susceptibilidad <i>in vitro</i> de levaduras frente a distintos antifúngicos.	37
Cuadro 2. Identificación morfológica, bioquímica y proteómica de aislamientos clínicos caracterizados previamente como <i>Trichosporon</i> spp. en laboratorios clínicos de Costa Rica (n = 17).	41
Cuadro 3. Patrones de susceptibilidad de 14 aislamientos clínicos de <i>Trichosporon</i> spp., provenientes de diversos sitios anatómicos.	43
Cuadro 4. Datos demográficos de los 17 aislamientos analizados en este estudio, obtenidos de micosis superficiales y sistémicas de pacientes en laboratorios clínicos de Costa Rica entre 1995 y 2021.	69

Índice de abreviaturas

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

ANOVA. Análisis de varianza.

ARN. Ácido ribonucleico.

CLSI. *Clinical Laboratory and Standard Institute.*

CMI. Concentración mínima inhibitoria.

CMI₅₀. Concentración mínima de antifúngico que inhibe al 50 % de las cepas estudiadas.

CMI₉₀. Concentración mínima de antifúngico que inhibe al 90 % de las cepas estudiadas.

CYTB. Gen que codifica el citocromo B.

DMSO. Dimetilsulfóxido.

EUCAST. *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing.*

IGS1. Fragmento de ADN que corresponde al espaciador intergénico 1, se encuentra entre los genes que codifican las moléculas 26S y 5S de ARNr.

ITS. Fragmento de ADN que corresponde al espaciador transcrito interno. Incluye las regiones ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S y está situada entre los genes 18S y 28S.

MSG. Medio Sabouraud Glucosado.

PAS. Ácido periódico de Schiff.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

PSA. Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos.

RPB1. Gen que codifica la subunidad más grande de la ARN polimerasa II.

RPB2. Gen que codifica la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II.

RPMI. *Roswell Park Memorial Institute.*

TEF1. Gen que codifica el factor de elongación de la traducción 1- α .

Justificación

Trichosporon es un género compuesto por hongos oportunistas causantes de un amplio espectro de enfermedades tales como: piedra blanca, onicomicosis, micosis invasivas y neumonitis por hipersensibilidad. A pesar de que su prevalencia es baja en comparación a otras enfermedades fúngicas como la dermatofitosis o la candidiasis, la vigilancia epidemiológica de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de aislamientos clínicos de *Trichosporon* es relevante en la salud pública, porque permite conocer el fenotipo de susceptibilidad de las cepas que infectan a los pacientes en Costa Rica y puede orientar a los profesionales en Medicina a seleccionar el tratamiento idóneo frente a las micosis generadas por este hongo.

Hipótesis

La especie de *Trichosporon* más prevalente en Costa Rica es *Trichosporon asahii*.

Los aislamientos clínicos de *Trichosporon*, analizados en este estudio, son susceptibles a la anfotericina B, el fluconazol, el itraconazol y el voriconazol.

Objetivo general

Analizar las especies prevalentes y la susceptibilidad antifúngica *in vitro* en aislamientos de *Trichosporon* obtenidos de micosis superficiales y sistémicas de pacientes de laboratorios clínicos de Costa Rica entre 1995 y 2021.

Objetivos específicos

1. Determinar las especies prevalentes de *Trichosporon* en aislamientos obtenidos de micosis superficiales y sistémicas de pacientes de laboratorios clínicos de Costa Rica entre 1995 y 2021.
2. Determinar los patrones de susceptibilidad *in vitro* de *Trichosporon* spp. a antifúngicos utilizados para el tratamiento de micosis superficiales y sistémicas.

Marco teórico

Trichosporon es un género compuesto por hongos basidiomicetes, no encapsulados, hialinos, anamórficos, que se reproducen por medio de artrosporas y blastosporas. Algunas de las especies de este género son de importancia médica, ya que pueden causar micosis oportunistas a nivel superficial y sistémico en el ser humano (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Colombo et al., 2011; Ellis y Kidd, 2022).

Algunos autores se refieren a *Trichosporon* como un hongo levaduriforme (*yeast-like*) o como una levadura (*yeast*). El término “levadura” es utilizado para separar a los hongos levaduriformes de los filamentosos. Esta clasificación se realiza según la morfología microscópica y colonial de cada género, o con base en otras de sus características fisiológicas, como el tipo de esporulación (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Bonifaz Trujillo, 2020; Colombo et al., 2011).

Las colonias de *Trichosporon* durante sus estadios tempranos presentan una morfología levaduriforme (forman colonias cremosas similares a las bacterianas), las cuales posteriormente adquieren la forma cerebriforme característica de este género (Gross y Salas, 2012). Los hongos del género *Trichosporon* comparten algunas características fisiológicas con otras levaduras de importancia médica, como el crecimiento rápido, la capacidad de formar biopelículas y la reproducción asexual mediante blastosporas. Sin embargo, a diferencia de estas, *Trichosporon* produce un talo micelial verdadero tanto en su forma parasitaria como saprofítica y también puede reproducirse mediante la producción de artrosporas (Bonifaz Trujillo, 2020). Debido a la complejidad de clasificar a *Trichosporon* dentro de alguno de estos grupos, la literatura también menciona la posibilidad de referirse a este hongo como una forma intermedia entre las levaduras y los hongos filamentosos clásicos (Bonifaz Trujillo, 2020).

Historia

En 1865, el médico alemán Hermann Beigel describió el primer caso de piedra blanca en el cabello de una peluca bajo el nombre “*champignon des chignons*” (que significa seta u hongo del moño), y su aislamiento fue estudiado por Gottlob Ludwig Rabenhorst, quien lo reportó

como un alga de la especie *Pleurococcus beigelii*. Se cree que en este cultivo probablemente se había aislado un *Aspergillus* como contaminante y no al agente etiológico (Ajello, 1994; Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Colombo et al., 2011). Luego, en 1890, Gustav Behrend describió al hongo causante de la piedra blanca de la barba del hombre como *Trichosporon ovoides*, en donde la etimología del género es una combinación entre las palabras griegas *Trichos* y *sporon*, que significan “pelo” y “esporas” respectivamente (Ajello, 1994; Colombo et al., 2011).

A inicios del siglo XX, a la piedra blanca se le llamó “*trichosporia nodosa*”. También se describió la piedra negra inicialmente como una variación de la piedra blanca (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019). Posteriormente, se reconocieron las piedras blanca y negra como dos entidades clínicas diferentes y con dos agentes etiológicos distintos, por lo que también se determinó que la piedra negra no es causada por *Trichosporon* sp.; sino por *Piedraia hortae*, un hongo negro, ascomicete y teleomorfo que en su forma parasitaria produce ascas y ascosporas (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019).

A partir de 1902, todos los hongos del género *Trichosporon* se designaron como *Trichosporon beigelii* en honor al Dr. Hermann Beigel, y siete años más tarde, Beurmann realizó un cultivo de una lesión cutánea en donde aisló *Oidium cutaneum*, que luego se reclasificó como *Trichosporon cutaneum*. En 1942, Diddens y Lodder consideraron a ambas especies como sinónimas, y a partir de ese momento, los micólogos del área ambiental usaban el taxón *Trichosporon cutaneum* mientras que los médicos, *T. beigelii* para referirse a los aislamientos de este hongo (Colombo et al., 2011; Diddens y Lodder, 1942).

Con la misma publicación de Diddens y Lodder, se describió por primera vez el hongo *Blastoschizomyces capitatus*, que se reportó como *Trichosporon capitatum*, luego se reclasificó dentro del género *Geotrichum* y finalmente dentro del género *Blastoschizomyces* (Colombo et al., 2011; Diddens y Lodder, 1942). Esta identificación errónea y reclasificaciones se deben posiblemente a que los tres géneros mencionados pertenecen a hongos que producen esporulación ártrica y comparten características bioquímicas y fisiológicas similares (Colombo et al., 2011).

En 1970 se reportó un caso clínico de un absceso cerebral en una mujer de África de 39 años, de la cual se le aisló *T. cutaneum* a partir del hemisferio cerebral izquierdo que estaba siendo

afectado por la metástasis de un adenocarcinoma bronquial localizado en su pulmón derecho (Montoya y González, 2014; Watson y Kallichurum, 1970). Este fue un suceso histórico bastante importante, porque se evidenció por primera vez la capacidad de *Trichosporon* para producir una enfermedad sistémica invasiva, ya que, hasta esa fecha este hongo solo se había asociado con micosis superficiales (Montoya y González, 2014; Watson y Kallichurum, 1970).

En la década de los 90, a partir de la investigación de Guého y colaboradores y con base en el estudio de la morfología, fisiología, ultraestructura y genómica de *Trichosporon*, se describió que este género está compuesto por las especies: *Trichosporon inkin*, *Trichosporon mucoides*, *Trichosporon asteroides*, *Trichosporon ovoides*, *T. asahii* y *T. cutaneum* (Guého et al., 1994; Guého, Smith, et al., 1992). También se recomendó no utilizar el taxón “*T. beigelii*” debido a su ambigüedad, ya que anteriormente todos los aislamientos de *Trichosporon* eran reportados utilizando este epíteto y no se tenía clara su sinonimia con respecto a las nuevas especies (Colombo et al., 2011; Guého et al., 1994; Guého, de Hoog, et al., 1992; Guého, Smith, et al., 1992; Mehta, Nayyar, et al., 2021).

A partir de este momento, se han ido describiendo otras especies para este género y no es adecuado utilizar el taxón *T. beigelii* (Colombo et al., 2011). Actualmente, *Trichosporon* es un género conformado por cinco clados: Gracile, Brassicae, Cutaneum, Porosum y Ovoides (Bonifaz Trujillo, 2020). Este género se constituye de un estimado de 50 especies, de las cuales aproximadamente 16 son de importancia médica ya que producen micosis oportunistas (Bonifaz Trujillo, 2020; Mehta, Nayyar, et al., 2021).

Clasificación taxonómica

Los hongos del género *Trichosporon* pertenecen al *phylum* Basidiomycota, cuyos integrantes se caracterizan por la presencia de un micelio con septos doliporos y fíbulas (conexiones que permiten el movimiento de núcleos entre compartimentos) (Boekhout et al., 2011; Bonifaz Trujillo, 2020; Hibbett et al., 2007). La clasificación taxonómica de *Trichosporon* es la siguiente: Filo Basidiomycota, Subfilo Agaricomycotina, Clase Tremellomycetes, Orden Trichosporonales, Familia Trichosporonaceae (Colombo et al., 2011; Liu et al., 2015).

Dentro del orden Trichosporonales, también se encuentra el género *Cryptococcus*; que son hongos levaduriformes que tienen la capacidad de producir cuadros sistémicos como meningitis y criptococosis pulmonar (Bonifaz Trujillo, 2020). A pesar de que las manifestaciones clínicas clásicas de las micosis causadas por *Cryptococcus* son bastante diferentes a las de *Trichosporon*, estos podrían confundirse dentro del laboratorio clínico. Esto debido a que *Trichosporon* y *Cryptococcus* presentan una estrecha relación taxonómica, tienen un perfil bioquímico similar y ambos forman colonias levaduriformes (Bonifaz Trujillo, 2020; Davies y Thornton, 2014; Gross y Salas, 2012; Guo et al., 2011).

Históricamente, la clasificación de Tremellomycetes se ha basado en características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, pero recientemente se han integrado herramientas moleculares para reconstruir las relaciones filogenéticas de los microorganismos que conforman este taxón (Liu et al., 2015). Una de las investigaciones más relevantes respecto a la taxonomía de esta clase es la de Liu y colaboradores (2015), quienes integraron análisis de secuencias de siete genes en conjunto con características fenotípicas de los Tremellomycetes. Algunos de los genes analizados corresponden a la región espaciadora transcrita interna (ITS), el factor de elongación de la traducción 1- α (*TEF1*), el citocromo B (*CYTb*) y subunidades de la ARN polimerasa II (*RPB1* y *RPB2*) (Liu et al., 2015). A partir de esta investigación se propusieron nuevos géneros, como *Cutaneotrichosporon*, *Apiotrichum* y *Effuseotrichosporon*, que están conformados por hongos basidiomicetes a los cuales no se les ha reportado la capacidad de formar basidiocarpo, reproducción sexual o presencia de metabolismo fermentador (Liu et al., 2015). Asimismo, es importante mencionar que *Trichosporon jirovecii*, *T. cutaneum*, *T. mucoides* y *T. dermatitis* fueron reclasificados dentro del género *Cutaneotrichosporon* (Ellis y Kidd, 2022; Liu et al., 2015). Además, las especies *T. loubieri*, *T. domesticum*, *T. mycotxinovorans* fueron incluidas en el género *Apiotrichum* y el género *Effuseotrichosporon* cuenta con una única especie: *E. vanderwaltii* (Ellis y Kidd, 2022; Liu et al., 2015).

Distribución geográfica y anatómica

Trichosporon está ampliamente distribuido en la naturaleza, principalmente en zonas tropicales y subtropicales con precipitaciones frecuentes. Se encuentra en el suelo, madera

en descomposición, aire, ríos, lagos, mares, queso, escarabajos, aves, murciélagos, palomas, ganado, y en excremento de aves, monos y macacos (Bonifaz Trujillo, 2020; Colombo et al., 2011).

Además, se puede encontrar en la microbiota de personas sanas (en estado de eubiosis) a nivel de la piel, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, vagina y en hombres: en el escroto y las regiones perianal e inguinal (Colombo et al., 2011; Silvestre et al., 2010). También es posible aislarlo a partir de heces de individuos sanos (Zhang et al., 2011). Las especies de *Trichosporon* más frecuentemente reportadas a partir de aislamientos clínicos son *T. asahii*, *T. mucoides*, *T. inkin*, *T. asteroides* y *Trichosporon faecale* (Bonifaz Trujillo, 2020; Malacrida et al., 2021).

Un estudio realizado por Zhang y colaboradores (2011) en personas sanas de Japón, muestra que, en los hombres, la detección de ADN (ácido desoxirribonucleico) de *Trichosporon* spp., en la piel, incrementa drásticamente a los 13 años, mientras que, en las mujeres, varía con la edad. A partir de los 60 años, disminuye la frecuencia de detección de este microorganismo en la piel de individuos sanos de ambos sexos (Zhang et al., 2011).

En un estudio realizado por Francisco y colaboradores (2019), de pacientes en Brasil que presentaban manifestaciones clínicas de infección por *Trichosporon* sp. (n = 358), se observó que la mayoría de los aislamientos se recuperaron de tracto urinario, seguido por: sangre o catéter venoso central, tracto respiratorio, cabello (piedra blanca), fluidos intraabdominales o torácicos, infecciones de heridas quirúrgicas, onicomycosis, músculo esquelético y humor vítreo; en orden descendiente. Treinta y seis de estos aislamientos provenían de otros sitios anatómicos. La especie que se detectó con mayor frecuencia fue *T. asahii*, seguido por (en orden descendiente): *T. inkin*, *T. faecale*, *T. asteroides*, *T. coremiiforme* (Francisco et al., 2019).

Modo de transmisión

Las personas se infectan de piedra blanca por contacto directo con el hongo, o con animales o personas infectadas (Bonifaz Trujillo, 2020). La infección puede ser de origen endógeno (a partir de la microbiota) o exógeno (mediante contacto con el cabello de las personas o como

una enfermedad de transmisión sexual) (Bonifaz Trujillo, 2020). También, se puede transmitir mediante fómites como peines, brochas y cosméticos (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019).

Por otro lado, la vía de infección de una micosis invasiva por *Trichosporon* se encuentra aún bajo estudio (Cho et al., 2015). Se especula que la infección es mayoritariamente endógena, en donde las mucosas o la piel pierden su integridad por factores debilitantes como la quimioterapia o implantación de dispositivos médicos; y permiten la entrada de microorganismos al torrente sanguíneo (Castano et al., 2021). Zhang y colaboradores (2011) argumentan que los genotipos de *T. asahii* que causan micosis invasiva son aquellos encontrados en la microbiota, mientras que aquellos encontrados en el ambiente no se asocian con esta patología.

La piedra blanca no se considera un factor de riesgo para desarrollar micosis invasiva por *Trichosporon* (Bennett et al., 2015; Castano et al., 2021). Sin embargo, en nuestro país se reportó un caso clínico atípico de una paciente femenina de 13 años, con leucemia linfocítica aguda, que presentó una fungemia por *Trichosporon asahii* secundaria a una piedra blanca durante su hospitalización (Solano Venegas et al., 2020). Se concluyó que el foco de infección primario estaba localizado en la cabeza de la paciente debido que se descartó que la vía de infección fuera a través de dispositivos médicos (el cultivo de catéteres y sondas resultó negativo para este hongo) y se aisló a *Trichosporon asahii* en hebras de cabello con nódulos hialinos y en un hemocultivo de la paciente, a la que se observaron placas alopecicas y lesiones ulcerativas en la raíz del cuero cabelludo y quien además presentaba diversos factores de riesgo para desarrollar una fungemia por *Trichosporon* (enfermedad hematológica de fondo, neutropenia, entre otros) (Solano Venegas et al., 2020).

Se han reportado brotes de piedra blanca en guarderías para niños en El Salvador y Brasil, donde el número de afectados fue de 15 y cinco respectivamente (Escalante y Ramírez, 2019; Roselino et al., 2008). Además, en un estudio epidemiológico de Bonifaz y colaboradores (2019), se evidenciaron tres casos en los que tanto la madre como la hija presentaban piedra blanca. También se han reportado brotes de micosis invasiva por *Trichosporon* en unidades de cuidados intensivos de neonatos en Estados Unidos y en India, donde el número de afectados fue de cuatro y ocho respectivamente (Fisher et al., 1993; Vashishtha et al., 2012).

Manifestaciones clínicas e incidencia

Piedra blanca

Las piedras son micosis superficiales (nodulares) que están adheridas al cabello de la cabeza (principalmente), axilas, pubis, barba y otros sitios con vello (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019). La piedra blanca es causada por *Trichosporon sp.* y la piedra negra, por *Piedraia hortae* (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019). Es muy poco frecuente la coinfección por ambos hongos (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019).

La piedra blanca se presenta como nódulos irregulares, blandos, adheridos al cabello, con distribución extra folicular, blanco-amarillentos, con bordes definidos, que miden de (1 - 3) mm, no producen inflamación y que forma varios nódulos en una misma hebra del cabello (Figura 1) (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Bonifaz Trujillo, 2020).



Figura 1. Nódulos hialinos de piedra blanca en cabello oscuro (a) y castaño (b) (algunos están señalados con flechas azules) (Tomado de Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019).

La enfermedad es asintomática, benigna y crónica (Bonifaz et al., 2019; Bonifaz Trujillo, 2020). Generalmente, esta micosis se detecta durante una exploración dermatológica cuando el paciente consulta por otra causa. Es decir, la mayoría del tiempo esta patología no es el motivo principal de consulta y su diagnóstico es incidental (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019).

Esta enfermedad se puede subclasificar en: piedra blanca *capitis*, que se presenta a nivel del cabello de la cabeza y es causado principalmente por *T. inkin* y *T. ovoides*; y piedra blanca crural (*cruris*) que es causada generalmente por *T. inkin* (Bonifaz Trujillo, 2020). La especie *T. asahii* es un agente etiológico menos frecuentes de la piedra blanca y se asocia principalmente con micosis invasivas (Bonifaz et al., 2019; Bonifaz Trujillo, 2020; Colombo et al., 2011; Montoya y González, 2014).

La mayor cantidad de casos de piedra blanca se presentan en Centroamérica y Suramérica, especialmente en las zonas indígenas de Brasil, Colombia, Venezuela y Panamá (Bonifaz Trujillo, 2020). En Estados Unidos se han reportado casos adquiridos en áreas endémicas (la mayoría) y autóctonos (Bonifaz Trujillo, 2020). En un laboratorio de servicio de Dermatología en Brasil entre 1998 y 2002, el 0,45 % de los pacientes atendidos (n = 3350) presentaron piedra blanca (Diniz y Souza Filho, 2005). Por otra parte, Bonifaz y colaboradores (2019) detectaron 14 casos de piedra blanca en un estudio retrospectivo de 12 años de México.

La piedra blanca se presenta comúnmente en personas adultas jóvenes, principalmente mujeres (Bonifaz Trujillo, 2020). Algunos factores que predisponen a desarrollar esta enfermedad son: hiperhidrosis, exceso de humedad en el cabello y mala higiene personal (Bonifaz Trujillo, 2020). La piedra blanca del cabello (piedra blanca *capitis*) es más frecuente en mujeres (posiblemente por tener cabello más largo que permanece húmedo durante más tiempo), mientras que, la piedra blanca en vellos genitales se presenta más frecuente en hombres (Bonifaz Trujillo, 2020).

Onicomycosis

La onicomycosis es una infección por hongos en las uñas de las manos y/o de los pies. Se caracteriza por alteraciones como: paquioniquia (engrosamiento), onicólisis (desprendimiento del lecho ungueal), distrofia, decoloración, fragilidad y/o melanoniquia (cambio en la coloración de la uña por tonos más oscuros) (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Gupta et al., 2020). Se puede catalogar según las manifestaciones clínicas (al analizar la región ungueal afectada) y obtener clasificaciones como: subungueal distal-lateral, distrófica total y blanca proximal subungueal (Arenas Guzmán y Torres Guerrero,

2019). También se puede clasificar según la etiología en dermatofitosis (causadas por dermatofitos), onicomicosis por hongos filamentosos no dermatofitos (incluye a *Trichosporon*) y en aquellas causadas por levaduras (Gupta et al., 2020).

Se estima que entre el 1,3 % al 10 % de las onicomicosis a nivel mundial son causadas por *Trichosporon* (principalmente *T. asahii*, *T. mucoides* y *T. inkin*) (Montoya y González, 2014). Este hongo produce onicomicosis secundaria a un trauma o a una lesión previa causada por otros hongos como los dermatofitos, por lo que se recomienda repetir el cultivo en caso de su aislamiento; para así cumplir con los criterios de Walshe y English (que son una guía de requisitos para que un aislamiento de un hongo filamentosos no dermatofito sea reportado como el agente etiológico de una onicomicosis) (Magalhães et al., 2016; Salas-Campos et al., 2007; Salas-Campos y Gross-Martínez, 2012; Walshe y English, 1966).

En Latinoamérica, algunas investigaciones reportan a *Trichosporon* como el agente etiológico de un bajo porcentaje de onicomicosis (menor a 5 %) (Colín Garnica et al., 2018; Magalhães et al., 2016; Mendoza y Rico, 2011; Salas-Campos et al., 2007). Por ejemplo, en un estudio observacional de México, se aisló *Trichosporon* en el 1,2 % ($n = 18$) de los cultivos obtenidos de las onicomicosis detectadas en la Sección de Micología del Hospital General Dr. Manuel Gea González y del Hospital Universitario de Puebla entre los años 2015 y 2017. Todos los casos de onicomicosis analizados en este estudio (de distintas etiologías) se observaron en uñas del pie ($n = 1408$) (Colín Garnica et al., 2018). La onicomicosis por *Trichosporon* fue más común en mujeres y la mediana de la edad de presentación fue de 62,5 años. No se reportó identificación a nivel de especie en este estudio (Colín Garnica et al., 2018).

Asimismo, en un estudio realizado por la Sección de Micología Médica de la Universidad de Costa Rica, se reportó el aislamiento de *Trichosporon* en un 4 % ($n = 2$) de las onicomicosis localizadas en los pies en las que fue posible aislar el agente etiológico (Salas-Campos et al., 2007). Esta misma sección se diagnosticó a *Trichosporon* en el 3,40 % de los aislamientos obtenidos a partir de los casos detectados de onicomicosis entre el 2007 y 2010 ($n = 147$) y este género se aisló solamente a partir de uñas de la mano (Salas-Campos y Gross-Martínez, 2012).

En el Laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina (Caracas, Venezuela), se detectó *Trichosporon* en el 0,13 % ($n = 14$) de los pacientes analizados entre 2000 y 2010 ($n = 11\ 000$) (Mendoza y Rico, 2011). Por otra parte, en un laboratorio de Micología de servicio de Dermatología de Brasil, se detectó *Trichosporon* en el 0,93 % de las onicomicosis analizadas entre 2003 y 2006 ($n = 5036$) y *T. ovoides* fue la especie de este género más frecuentemente diagnosticada (Magalhães et al., 2016).

Micosis invasiva por Trichosporon

De acuerdo con la literatura, la definición de micosis invasiva varía de acuerdo al agente etiológico: hongos filamentosos, levaduriformes, pneumocistosis o micosis endémicas (Donnelly et al., 2020). La micosis invasiva o enfermedad fúngica invasiva comprobada (*proven invasive fungal disease*) causada por levaduras es una infección por hongos en un sitio anatómico estéril, diagnosticada mediante observación microscópica de formas parasitarias del hongo y/o su aislamiento a partir de un aspirado o biopsia (Donnelly et al., 2020). Para una criptococosis (que es también una micosis invasiva causada por levaduras), el diagnóstico serológico de antígeno en fluido cerebroespinal o sangre también es confirmatorio de micosis invasiva comprobada (Donnelly et al., 2020). La literatura hace énfasis en que ante un hemocultivo, la levadura aislada debe tener concordancia con los síntomas y signos del paciente (Mehta, Nayyar, et al., 2021).

Por otra parte, una micosis diseminada corresponde una enfermedad micótica en donde hay fungemia con infección de dos órganos no continuos (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016). Se considera que esta definición también debería incluir la diseminación de una micosis superficial o subcutánea a través de la piel, donde la fungemia no está necesariamente incluida.

La micosis invasiva por *Trichosporon* es causada principalmente por *T. asahii* y *T. mucoides* y se presenta generalmente en pacientes con algún factor de riesgo como neutropenia, trasplantados inmunosuprimidos con corticoesteroides, o pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Bonifaz Trujillo, 2020). Otros factores de riesgo son: implantación y uso de dispositivos médicos como un catéter venoso central o una prótesis cardíaca, estadías largas en unidad de cuidados intensivos, diálisis de peritoneo, neonatos con

bajo peso al nacer, pacientes con neoplasia hematológica o de un órgano sólido y/o que reciban quimioterapia citotóxica (Arendrup et al., 2014; Castano et al., 2021).

Esta enfermedad se puede presentar en tres variedades: micosis diseminada, afectación localizada en un órgano o infección de catéteres sin alteración de órganos. Generalmente, inicia como un proceso febril agudo, que no responde ante terapia antibacteriana empírica, y que puede progresar a sepsis y falla multiorgánica (Castano et al., 2021). El 70 % de los casos presentan fungemia y la mortalidad es del 30 al 77 % (Castano et al., 2021). Además de la fiebre y la fungemia, otras manifestaciones clínicas son la formación de abscesos en órganos y tejidos como: corazón, cerebro, peritoneo, articulaciones y vías urinarias (Montoya y González, 2014).

Las manifestaciones cutáneas en una micosis invasiva diseminada por *Trichosporon* son poco frecuentes, similares a las de una candidiasis diseminada; se presentan generalmente en el tronco y extremidades de pacientes inmunocomprometidos o con alguna enfermedad crónica y pueden incluir: máculas, pápulas con escara, necrosis, eritema, vesículas, pústulas y nódulos (Castano et al., 2021; T. Itoh et al., 1996; Pierard G.E. et al., 1992; Salazar y Campbell, 2002). En los pacientes con micosis invasiva por *Trichosporon* con afectación renal, se puede presentar proteinuria, hematuria e insuficiencia renal, y en aquellos con afectación pulmonar algunos hallazgos clínicos frecuentes son: dificultad respiratoria, tos productiva y esputo con sangre y una radiografía de tórax en donde se observan diversos tipos de infiltrado (Castano et al., 2021).

Recientemente, se han reportado infecciones secundarias por hongos que aumentan la mortalidad en pacientes con COVID-19 (Corrêa-Junior et al., 2022; Kuchi Bhotla et al., 2021). En pacientes con COVID-19 se han reportado algunos casos de micosis invasiva por *Trichosporon*, especialmente en aquellos que se administraron inmunosupresores y antibióticos (Ali et al., 2021; Cronyn et al., 2021; Nobrega de Almeida et al., 2021; Samaddar et al., 2022; Segrelles-Calvo et al., 2021). A este momento, es escaso el conocimiento sobre las infecciones por *Trichosporon* en pacientes hospitalizados con COVID-19. A pesar de esto, es evidente que estos casos son poco frecuentes y que *Trichosporon* no es el principal agente fúngico que complica el pronóstico de pacientes hospitalizados por COVID-19 (Benelli et al., 2022; Corrêa-Junior et al., 2022; Hoenigl et al., 2022). Según la literatura

actual, *T. asahii* es la especie más frecuente de este género que causa micosis invasivas en pacientes hospitalizados por COVID-19 (Benelli et al., 2022; Corrêa-Junior et al., 2022).

Otras micosis causadas por *Trichosporon*

Trichosporon spp., también puede causar otomicosis, neumonía, endocarditis, encefalitis, queratitis micótica e infección cutánea en los intertrigos (Bonifaz Trujillo, 2020). Se ha reportado a *T. asahii* como causante de infección urinaria en 23 pacientes de cuidados intensivos, en donde se realizaron diagnósticos de infección urinaria a partir del conteo de $\geq 10^4$ UFC/mL del hongo en la orina (Sun et al., 2012). De hecho, es bastante común que la orina sea la principal muestra de donde se aísla a *Trichosporon* (Ahmad et al., 2005; Arabatzis et al., 2014; Colombo et al., 2011; Francisco et al., 2019).

Por otro lado, *T. asahii* ha sido asociado como el principal agente etiológico de la neumonitis por hipersensibilidad (*Summer-type Hypersensitivity Pneumonitis*); que consiste en un proceso de hipersensibilidad tipo III o IV causado por inhalar ciertos antígenos (por ejemplo: fúngicos o bacterianos). Esta patología se presenta principalmente en ambientes cálidos y húmedos de algunas regiones del sur y oeste de Japón durante el verano y se puede confundir con neumonía (Colombo et al., 2011; Nakajima et al., 2013). El glucoronoxilomanano es un alérgeno expresado en la pared celular de *Trichosporon* que se asocia con esta enfermedad (Colombo et al., 2011).

Patogénesis

En la piedra blanca, se especula que las esporas realizan el contacto con el cabello a un nivel cercano del *ostium* folicular, la infección progresa con el crecimiento del cabello y factores ambientales como la humedad favorecen la aparición de los nódulos, que se forman gracias a una sustancia adherente que tiene una composición presuntiva de oligosacáridos (Bonifaz Trujillo, 2020). Una vez formados los nódulos, el hongo se encuentra por debajo de la cutícula y no afecta la corteza ni la médula del cabello (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Bonifaz Trujillo, 2020).

En una investigación experimental, se indujo la infección de *Trichosporon* sobre un modelo *in vitro* (cabello) y se estudiaron las diferentes etapas en la formación y la composición de

los nódulos. La etapa inicial consiste en el contacto del cabello con el hongo, continua con la adhesión del hongo a lo largo del tallo piloso, luego con el tapizado de la región extrafolicular del cabello y culmina con la generación de un nódulo maduro, formado mediante la excreción de la sustancia adherente (Inácio et al., 2016).

Posterior a la formación de un nódulo maduro, se genera una lesión sobre la cutícula del cabello debido a la afectación a las células cuticulares. La naturaleza blanda en los nódulos se atribuye al escaso contenido de azufre y a la ausencia de calcio (Inácio et al., 2016). También se especula que algunas bacterias como *Corynebacterium* pueden tener un efecto sinérgico en la formación de los nódulos y fomentar el crecimiento de *Trichosporon* (Bonifaz et al., 2019; Castano et al., 2021; Youker et al., 2003).

En la onicomycosis por *Trichosporon*, la información bibliográfica encontrada sobre los mecanismos de patogenicidad fue muy escasa. De manera general, se conoce que en la onicomycosis por hongos filamentosos no dermatofitos, el daño se relaciona con una previa lesión ungueal que permite la infección de hongos oportunistas, los cuales no presentan queratinasas (enzimas que degradan la queratina, principal componente de las uñas) (de Magalhães Lima et al., 2007; Magalhães et al., 2016). Entre el 3 % y el 11 % de los casos de onicomycosis se presenta la coinfección por un dermatofito y/o un hongo filamentosos no dermatofito, pero no se conoce el rol del hongo oportunista en estos casos (Gupta et al., 2020).

Por otra parte, en la micosis invasiva por *Trichosporon* se han estudiado principalmente los factores de virulencia de *T. asahii* (Castano et al., 2021; Montoya y González, 2014). De forma general, la producción de una matriz extracelular (compuesta por polisacáridos, proteínas y ADN) le permite adherirse y generar biopelículas; y algunas enzimas (como proteasas, fosfolipasas y hemolisinas) facilitan la obtención de nutrientes en el medio (Castano et al., 2021; Colombo et al., 2011; Montoya y González, 2014). La invasión del hongo desde una mucosa hacia un tejido estéril se atribuye a factores exógenos como la pérdida de la integridad del epitelio asociada a quimioterapia o implantación de catéteres, pero se especula que algunas lipasas del hongo también pueden contribuir con este proceso (Castano et al., 2021; Colombo et al., 2011). Además, se ha reportado que la expresión de

glucoronoxilomanano en la pared celular impide la fagocitosis de neutrófilos y monocitos (Colombo et al., 2011; Montoya y González, 2014).

Pronóstico y complicaciones

Como se indicó, la piedra blanca es una infección asintomática, benigna y crónica (Bonifaz Trujillo, 2020). Los relapsos son frecuentes, pero la eliminación del vello afectado es curativa (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Bonifaz et al., 2019).

Bonifaz y colaboradores (2019) reportan un 78,6 % ($n = 14$) de curación para pacientes tratados con champú a base de 2 % ketoconazol durante un mes. Además, mencionan que, en pacientes con cabello largo donde persiste la humedad, puede ser necesario usar tratamiento antifúngico oral en combinación con el tópico (Bonifaz et al., 2019).

No se encontraron reportes sobre la tasa de curación de una onicomycosis por *Trichosporon*. Sin embargo, se habla de que el tratamiento de las onicomycosis por hongos filamentosos no dermatofitos es más difícil y largo, y el porcentaje de curación es menor; si se compara con una onicomycosis por dermatofitos (Gupta et al., 2020; Salas-Campos et al., 2007).

Las micosis invasivas por *Trichosporon* tienen altos porcentajes de mortalidad ((40 - 60) %), pero el pronóstico de cada paciente con esta entidad clínica varía según su estado general de salud (patologías subyacentes y estado inmunológico) (Castano et al., 2021). Algunos de los factores de buen pronóstico son: recuento de neutrófilos normal al momento del diagnóstico o recuperarse rápidamente de la neutropenia y/o el retiro oportuno del dispositivo médico infectado, si este es el foco de infección primario (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Castano et al., 2021). Se han reportado relapsos de la infección en el sistema nervioso central en receptores de trasplantes (Castano et al., 2021).

Diagnóstico de laboratorio

Examen directo

En un caso sospechoso de piedra blanca, se cortan hebras del cabello infectado, se colocan en una placa Petri o portaobjetos, se les añade hidróxido de potasio (KOH) al 10 % o 20 % y

se observan al microscopio o estereoscopio (Bonifaz Trujillo, 2020; Gross y Salas, 2012). En el examen directo, se observa parasitación ectothrix y nódulos blanquecinos sobre la hebra del cabello (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019). La observación de micelio hialino con artrosporas y blastosporas es de valor diagnóstico para esta enfermedad (Gross y Salas, 2012) (Figura 2). No es necesaria la observación histopatológica en el diagnóstico de piedra blanca (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019).

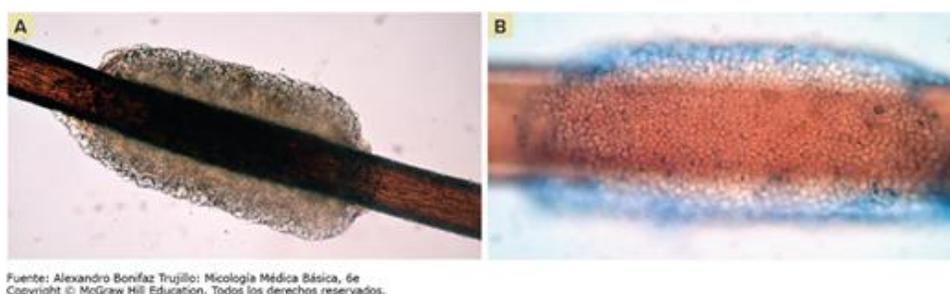


Figura 2. Fase parasitaria de la piedra blanca. Observación microscópica directa de las estructuras parasitarias (micelio hialino con artrosporas y blastosporas) en la hebra de un cabello infectado con *Trichosporon* spp., previamente tratado con hidróxido de potasio (KOH). A) 10X B) 40X. (Tomado de Bonifaz Trujillo, 2020).

Ante una onicomicosis, se recolecta el material de la uña o uñas lesionadas, se le añade KOH al 40 % y se observa al microscopio (Gross y Salas, 2012). Ante una infección por *Trichosporon* se observa micelio hialino, sin embargo, otros hongos pueden formar esta estructura. Consecuentemente, es necesario realizar un cultivo para identificar correctamente al agente etiológico (Gross y Salas, 2012).

En una biopsia o aspirado se puede observar la fase parasitaria mediante tinciones como Grocott, ácido periódico de Schiff (PAS) o Gram. En el examen directo, las estructuras se pueden confundir con *Candida* y resulta importante buscar la presencia de artrosporas para un diagnóstico adecuado (Figura 3) (Bonifaz Trujillo, 2020).

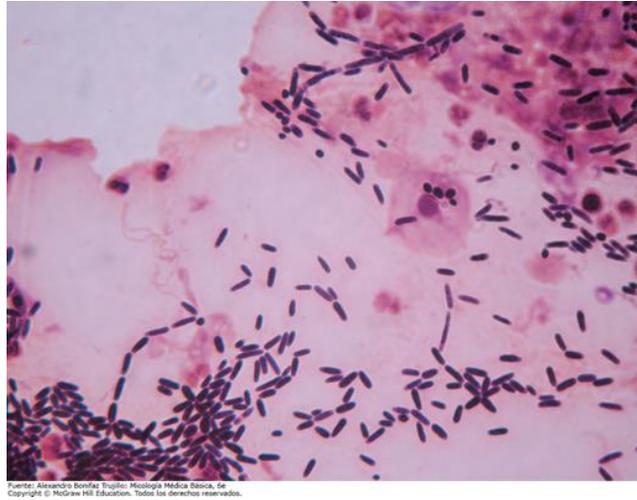


Figura 3. Observación microscópica directa de una expectoración donde se observa micelio con artrosporas y blastosporas de *Trichosporon* (Tinción Gram, aumento 100X) (Tomado de Bonifaz Trujillo, 2020).

Cultivo

En caso de piedra blanca u onicomicosis, se colocan fragmentos del material recolectado sobre el medio de cultivo. Se puede utilizar medio agar Sabouraud glucosado (MSG) y agar Mycosel® (aunque algunas cepas son inhibidas por la cicloheximida) (Gross y Salas, 2012). Se recomienda repetir el cultivo en caso de aislar *Trichosporon* a partir de una onicomicosis, al tratarse de un hongo filamentoso no dermatofito (Salas-Campos et al., 2007; Walshe y English, 1966). Ante una sospecha de micosis invasiva, se recomienda usar agar sangre y MSG (Gupta et al., 2020).

Trichosporon es un hongo de crecimiento rápido, por lo que luego de cuatro o cinco días, se visualizan colonias que son hialinas al anverso y al reverso, sin pigmento, blancas o amarillas, cremosas y cerebriformes (tienen forma de cerebro) (Gross y Salas, 2012). A partir de estas colonias se puede realizar un montaje con azul de lactofenol y observar micelio con artrosporas y blastosporas; que es característico del género (Bonifaz Trujillo, 2020; Gross y Salas, 2012) (Figura 4).

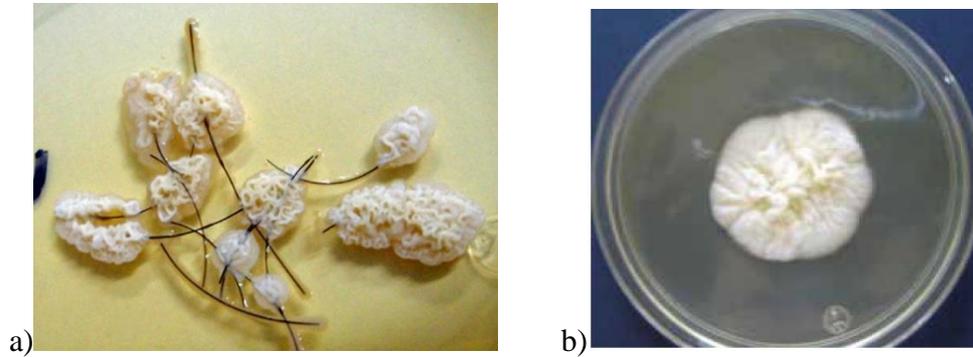


Figura 4. Cultivo de *Trichosporon* a) a partir de una piedra blanca (Recuperado de Ellis y Kidd, 2021) b) en un cultivo puro (Tomado de Gross y Salas, 2012).

Autores como Bonifaz y colaboradores (2019) reportan las características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) de distintas especies de *Trichosporon*. Sin embargo, para realizar la identificación a nivel de especie en estos hongos se requiere adicionalmente de otras técnicas; por ejemplo, pruebas bioquímicas de asimilación de distintas fuentes de carbono (como glucosa, la lactosa y la galactosa) y nitrógeno (como cadaverina y nitrito) (Gross y Salas, 2012; Sugita, 2011). Es posible observar apresorio (órgano de fijación) en las etapas tardías del cultivo (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019). Otros autores han reportado la observación de este órgano de fijación al cultivar *Trichosporon* en agar harina de maíz (Figura 5) (Shivaprakash et al., 2011).

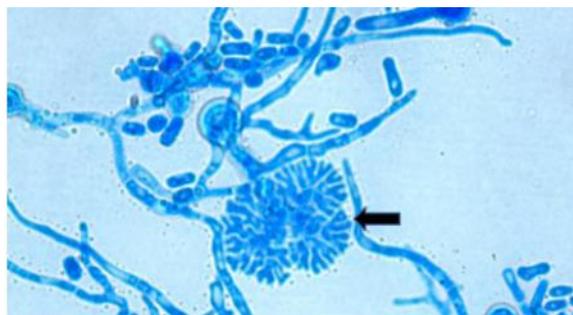


Figura 5. Apresorio de *T. inkin* cultivado durante tres días en agar harina de maíz (Tomado de Shivaprakash et al., 2011).

Urea

La prueba de la ureasa contribuye a la identificación de *Trichosporon* a nivel de género, ya que las cepas de este hongo son ureasa positivas (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019). Este método bioquímico se basa en repicar el hongo sobre agar urea de Christensen, incubar a temperatura ambiente por una semana y luego observar el color del medio: si este se torna rosado indica que el hongo expresa la enzima ureasa, la cual degrada la urea a amonio y dióxido de carbono y se genera carbonato de amonio que alcaliniza el medio; que posee rojo de fenol (indicador ácido-base) (Gross y Salas, 2012). Por el contrario, si el color del medio permanece amarillo indica la no detección de ureasa (Gross y Salas, 2012).

Métodos comerciales automatizados y semiautomatizados

Algunos de los métodos comerciales disponibles para la identificación de levaduras son: API[®] (ID 32C), Microscan, VITEK[®]2 y Maldi Biotyper[®] (Bonifaz Trujillo, 2020; Patel, 2019, Pincus, 2006). El sistema VITEK[®]2 es un método automatizado con la capacidad de identificar tres especies de *Trichosporon*: *T. asahii*, *T. inkin* y *T. mucoides* a partir de un cultivo puro (Colombo et al., 2011; Pincus, 2006). La tarjeta YST del VITEK[®]2 utiliza 46 pruebas metabólicas en donde se mide el uso de una fuente de carbono o nitrógeno y actividad de algunas enzimas, lo compara con un patrón típico de cada organismo y realiza una identificación con base en la similitud del perfil bioquímico entre la muestra y el patrón (se mide como probabilidad); los resultados se proporcionan aproximadamente a las 18 horas de iniciado el ensayo (Pincus, 2006).

El sistema API[®] ID 32C (bioMérieux, Francia), es un sistema semiautomatizado que identifica las mismas tres especies de *Trichosporon* del método anterior y utiliza 32 pruebas bioquímicas para la identificación (bioMérieux SA, 2011).

Por otra parte, la tecnología MALDI-TOF (del inglés: *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry*, que en español significa: desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) se basa en el análisis de las proteínas expresadas por el microorganismo (principalmente ribosomales) y su comparación con patrones específicos de cada taxón (género, especie e inclusive

subespecie) para emitir una identificación (Maldonado et al., 2017). *Grosso modo*, a partir de un cultivo puro, se coloca una colonia sobre una placa metálica. Los hongos filamentosos requieren un tratamiento previo para la extracción de proteínas (Maldonado et al., 2017). Dentro del equipo, la muestra es primero ionizada a fase gaseosa, luego pasa por analizador que separa los iones de acuerdo a su relación masa/carga (separación TOF o tiempo de vuelo) y finalmente llegan a un detector que genera un perfil espectral de la muestra (Maldonado et al., 2017).

Los sistemas VITEK[®] MS (bioMérieux, Francia) y Maldi Biotyper[®] (Bruker[®] Daltonics, Alemania) utilizan la tecnología MALDI-TOF para la identificación de bacterias y hongos mediante espectrometría de masas (Maldonado et al., 2017; Patel, 2019). Al realizar un análisis proteómico mediante la tecnología MALDI-TOF en el equipo Maldi Biotyper se pueden identificar los taxones *T. asahii*, *T. inkin* y grupo *T. mucoides* (que incluye a *T. mucoides* y *T. dermatis*) (Patel, 2019). La tecnología MALDI-TOF ha mostrado tener una gran precisión para la identificación *Trichosporon* a nivel de género (alrededor de 95 %) y especie (entre 73 % al 100 %) cuando se compara con los análisis moleculares y genómicos (Guo et al., 2019; Parashar et al., 2022).

En rendimiento de los sistemas de identificación de VITEK[®]2 y Maldi Biotyper depende de si las especies analizadas están incluidas en la base de datos del laboratorio que realiza la identificación (Guo et al., 2019; Parashar et al., 2022). Si se analiza algún taxón de *Trichosporon* no incluido en la base de datos del software utilizado, se obtiene una caracterización errónea o no se logra obtener una identificación (Ahmad et al., 2005; Chagas-Neto et al., 2009; de Figueiredo et al., 2014; Guo et al., 2011, 2019). Sin embargo, debe considerar que estas técnicas están diseñadas para la identificación de microorganismos de importancia médica; y que los taxones no incluidos en estas bases de datos (como algunas especies de *Trichosporon*) generalmente son detectados con menor frecuencia en aislamientos clínicos de pacientes (de Almeida et al., 2017; Guo et al., 2011, 2019).

Métodos no rutinarios y reacciones cruzadas

No se disponen de reacciones serológicas comerciales para la identificación de *Trichosporon* (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019). Sin embargo, es importante mencionar que en un estudio de neumonitis por hipersensibilidad del tipo verano asociada a *T. asahii*, se analizaron los títulos de anticuerpos anti-*Trichosporon* en el suero de pacientes con la enfermedad mediante una prueba de aglutinación que posiblemente fue del tipo *in house* (Nakajima et al., 2013). Se podría utilizar la detección de $(1\rightarrow3) - \beta - D -$ glucano ante sospecha de micosis invasiva, sin embargo esta prueba no es específica de *Trichosporon* (Colombo et al., 2011).

La prueba de aglutinación de partículas de látex para detectar antígenos capsulares en *Cryptococcus* presenta reacción cruzada con *Trichosporon* debido a que este hongo (*Trichosporon*) presenta una pseudocápsula con composición similar a la cápsula de *Cryptococcus*; específicamente la reacción cruzada se asocia a la expresión de glucoronoxilomanano en *Trichosporon* (Gross y Salas, 2012; Mehta, Nayyar, et al., 2021). También en una micosis invasiva por *Trichosporon* se pueden generar falsos positivos en la prueba para la detección de galactomananas ante una sospecha de aspergilosis (Lee y Goldman, 2021).

A nivel de investigación, los métodos moleculares y genómicos para identificar hongos se basan en el análisis de regiones de ARN (ácido ribonucleico) o ADN. Algunas de las regiones de ADN frecuentemente analizadas para la identificación fúngica son ITS o *CYTB*, cuya homología y resolución varía según el taxón analizado (Liu et al., 2015; Raja et al., 2017; Sugita et al., 2002). En el caso de los hongos del género *Trichosporon*, éstos presentan una región ITS muy conservada, por lo que no es buen marcador para la discriminación a nivel de especie (Sugita et al., 2002; D. Zhang et al., 2019). Por el contrario, la región IGS1 (región del espaciador intergénico 1) tiene una diversidad alta en *Trichosporon* spp., por lo que la secuenciación de este fragmento se considera el estándar de oro para identificar *Trichosporon* spp. (Chagas-Neto et al., 2009; Sugita et al., 2002; D. Zhang et al., 2019).

La secuenciación de la región IGS1 también puede utilizarse para caracterizar distintos genotipos de *T. asahii*, lo cual ha sido utilizado en distintas investigaciones que estudian la correlación entre los genotipos con el sitio anatómico infectado y la susceptibilidad antifúngica (Francisco et al., 2019). Este es un tema que aún continúa en investigación, pero

se puede mencionar que los genotipos de *T. asahii* G1, G3, G4, G5 y G7 son los que más frecuentemente causan micosis en el ser humano y pueden infectar los mismos sitios anatómicos en diferente proporción (Francisco et al., 2019).

Al momento de realizar la caracterización de *Trichosporon* sp., a nivel de especie, en la literatura científica se han reportado discrepancias entre las tecnologías basadas en fenotipo (como VITEK®2 y MALDI-TOF) y aquellas basadas en análisis moleculares o genómicos (Ahmad et al., 2005; Chagas-Neto et al., 2009; de Figueiredo et al., 2014; Guo et al., 2011, 2019).

Por ejemplo, en el año 2005, en una investigación de Kuwait se estudiaron 29 aislamientos clínicos de *Trichosporon* spp. En primer lugar, el 100 % de los aislamientos fueron identificados como *T. asahii* mediante el software VITEK® 2 (Ahmad et al., 2005). Posteriormente, estos se analizaron mediante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la región ITS con cebadores específicos para *T. asahii*. La región ITS analizada incluyó el segmento ITS 1, ITS 2 y el gen de ARNr 5.8S. Al realizar el análisis molecular (PCR) no se detectaron cuatro muestras, lo que sugirió la presencia de otras especies diferentes a *T. asahii* (Ahmad et al., 2005). Un análisis genómico realizado mediante secuenciación de la región ITS con un imprimador universal para hongos o PanFungal comprobó que estos cuatro aislamientos no correspondían a *T. asahii*, sino a *T. asteroides* (Ahmad et al., 2005).

Esta identificación molecular de Adhmad y colaboradores (2005) puede tener algunas limitaciones, ya que la región ITS no corresponde a la región molecular óptima para la caracterización de *Trichosporon* a nivel de especie. Al contrario, se ha descrito que la secuenciación de la región IGS1 corresponde al estándar de oro para caracterizar las diferentes especies de este género (Chagas-Neto et al., 2009; Sugita et al., 2002; Zhang et al., 2019).

Un reporte de caso clínico del 2006 respalda las limitaciones de utilizar la región ITS para identificar las distintas especies de *Trichosporon* (Gunn et al., 2006). En este reporte se aisló una cepa levaduriforme proveniente de una fungemia. Esta se identificó como *T. mucoides* con los sistemas VITEK®1 y VITEK®2 con un excelente nivel de confianza y con índices t de 1 y 96,55; respectivamente (Gunn et al., 2006). Esta misma cepa se caracterizó como *T. mucoides* mediante un análisis molecular (PCR) de las regiones ITS e IGS1; y se identificó

como *T. dermatis* al secuenciar los segmentos ITS e IGS1 (la homología fue 99 % y 100 %, respectivamente) (Gunn et al., 2006). Al realizar identificación taxonómica basada en análisis moleculares (es decir; secuenciación), se considera que una homología mayor a 99,5 % es aceptable para reportar la especie de un aislamiento levaduriforme (de Figueiredo et al., 2014; Hu et al., 2019; Pfaller et al., 2012).

La comparación entre los diferentes sistemas para caracterizar levaduras debe realizarse considerando las ventajas y limitaciones de cada uno. Los análisis moleculares y genómicos permiten la identificación de un mayor número de especies y pueden tener mayor veracidad, sin embargo, estos son costosos, poco disponibles para la mayoría de laboratorios clínicos y su metodología no está estandarizada y/o validada, lo cual limita su uso (Colombo et al., 2011; Davies y Thornton, 2014; Pincus et al., 2007). En contraposición, los sistemas de identificación VITEK®2, VITEK® MS y Maldi Biotyper tienen procedimientos estandarizados que fueron aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), por lo que son una metodología válida para la identificación de levaduras de importancia médica y tienen mayor aplicabilidad en análisis de rutina que otros métodos (U.S. Food and Drug Administration, 2017; Patel, 2019).

Diagnóstico diferencial

A nivel clínico, la piedra blanca se debe de distinguir de otras enfermedades que se presentan en los vellos como: pediculosis, tricomicosis axilar, tricolorrexis nodosa, tiña de la cabeza y dermatitis seborreica (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Bonifaz Trujillo, 2020).

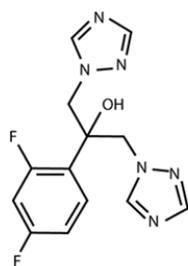
La onicomycosis por *Trichosporon* requiere el diagnóstico diferencial con otros agentes causantes de esta patología como dermatofitos, levaduras y otros hongos filamentosos no dermatofitos (Gupta et al., 2020). Además, con enfermedades ungueales como: psoriasis, liquen plano, traumatismo, infecciones bacterianas y dermatitis atópica (Ballesté et al., 2003; Elewski, 1998; Gupta et al., 2020).

Por otra parte, en la micosis invasiva por *Trichosporon* se debe realizar un diagnóstico diferencial con otras enfermedades fúngicas invasivas como: candidiasis sistémica,

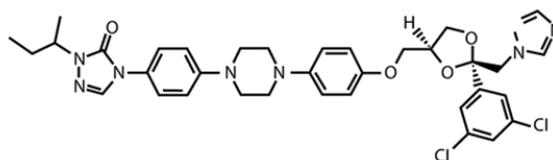
aspergilosis y criptococosis (Castano et al., 2021). También se recomienda, valorar la posibilidad de coinfecciones con hongos, bacterias o virus (Castano et al., 2021).

Tratamiento

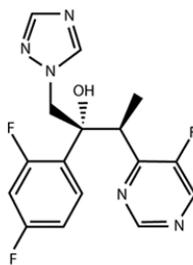
Para esta investigación, los antifúngicos analizados fueron los azoles (fluconazol, itraconazol y voriconazol) y un polieno (anfotericina B). Los azoles son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos con anillos heteropentacíclicos que tienen sustituciones de carbono por nitrógeno unidos a otros anillos aromáticos (Bonifaz Trujillo, 2020; Nocua-Báez et al., 2020). Con base en el número de nitrógenos que tenga el anillo heteropentacíclico, los antifúngicos derivados de los azoles se subclasifican en imidazoles y triazoles, que tienen un anillo de dos y tres nitrógenos; respectivamente (Matin et al., 2022; Nocua-Báez et al., 2020; Pérez et al., 2021). El anillo triazólico y otras diferencias estructurales, les confieren a los triazoles un mayor espectro de actividad, una mayor actividad antifúngica y una menor toxicidad que los imidazoles (Figura 6) (Bonifaz Trujillo, 2020; Allen et al., 2015; Pérez et al., 2021). Además, estas diferencias estructurales influyen sobre su vía de administración, puesto que generalmente, los imidazoles son de uso tópico, mientras que los triazoles se administran en forma oral o parenteral (Bonifaz Trujillo, 2020).



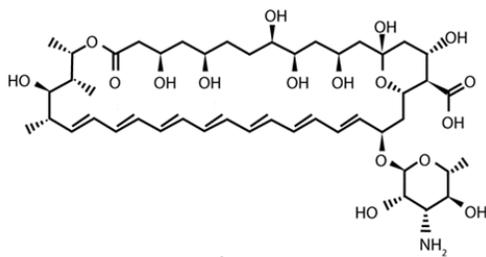
Fluconazol



Itraconazol



Voriconazol



Anfotericina B

Figura 6. Estructura química de los antifúngicos analizados en este trabajo (Tomado de Bonifaz Trujillo, 2020)

Los triazoles de primera generación son el itraconazol y el fluconazol y los de segunda generación, el voriconazol, el ravuconazol y el posaconazol (Allen et al., 2015; Bonifaz Trujillo, 2020). El voriconazol es estructuralmente similar al fluconazol, excepto porque presenta un grupo de fluoropirimidina, en lugar de un grupo triazol, y la adición de un grupo metil; lo cual aumenta su afinidad por el sitio blanco (Figura 6) (Allen et al., 2015; Escobar y Zuluaga, 2004).

El átomo de nitrógeno libre del anillo triazólico puede unirse al átomo de hierro del grupo hemo de la enzima lanosterol 14 α desmetilasa; que convierte el lanosterol en ergosterol; un componente fundamental en la membrana celular fúngica (Berkow y Lockhart, 2017; Bonifaz Trujillo, 2020; Escobar y Zuluaga, 2004). Esta unión inhibe la enzima y por ende, inhibe la biosíntesis del ergosterol, ocasionando un efecto fungistático sobre hongos que son susceptibles a los triazoles (Berkow y Lockhart, 2017; Bonifaz Trujillo, 2020).

Los polienos se caracterizan por ser lipofílicos y componerse de un anillo de lactona y un anillo de 26 a 38 carbonos. La anfotericina B es macrólido poliénico del tipo heptaeno con un residuo de micosamina (Figura 6) (Bonifaz Trujillo, 2020; Cavassin et al., 2021). Es un fármaco de alta efectividad frente a las micosis invasivas, debido a su alta actividad fungicida, su amplio espectro de actividad y su baja tasa de resistencia (Bonifaz Trujillo, 2020; Cavassin et al., 2021). La anfotericina B tiene poca solubilidad en agua, por lo que en las formulaciones farmacéuticas se emplean distintos métodos para formar micelas que aumentan la solubilidad y distribución del fármaco (Cavassin et al., 2021).

La cadena poliénica de la anfotericina B es hidrofóbica y permite que el fármaco se adhiera al ergosterol de la membrana plasmática de los hongos. Posterior a esta interacción, el fármaco induce la formación de poros, la salida de electrolitos al medio extracelular y la lisis y muerte del hongo (Cavassin et al., 2021; Bonifaz Trujillo, 2020). Esta porción hidrofóbica de la anfotericina B puede adherirse, con menor afinidad, al colesterol de la membrana plasmática de las células humanas, por lo tanto, puede alterar el riñón, el corazón y células hematológicas (Cavassin et al., 2021). La formulación convencional de este fármaco es la anfotericina B desoxicolato, que es altamente nefrotóxica (Bonifaz Trujillo, 2020).

Con la finalidad de disminuir su toxicidad, se desarrollaron formulaciones basadas en lípidos que son la anfotericina B lipídica, la anfotericina B liposomal y la anfotericina B de dispersión coloidal (esta última ya no es fabricada por la industria farmacéutica) (Cavassin et al., 2021; Montagna et al., 2014). A pesar de contar con el mismo principio activo, cada formulación de anfotericina B tiene un perfil farmacológico y farmacocinético distinto, que puede influir sobre su efectividad terapéutica; incluso, se ha reportado variabilidad entre la composición, la carga y el tamaño de las formulaciones basadas en lípidos según el fabricante (Cavassin et al., 2021). Por lo tanto, aún continúa en estudio el perfil farmacológico de estas nuevas formulaciones y su comparación respecto a la convencional (Cavassin et al., 2021).

A nivel de investigación, se ha estudiado principalmente diferencias en la actividad *in vivo* de la anfotericina B según el tipo de formulación y es limitada la información sobre diferencias o similitudes *in vitro* (Montagna et al., 2014). En la metodología del CLSI, que es utilizada en este trabajo, se emplea anfotericina B disuelta en DMSO (dimetilsulfóxido) y se determina la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de hongos frente a la anfotericina B *per se* (Cantón et al., 2007). Montagna y colaboradores (2014) encontraron una fuerte correlación entre la actividad biológica *in vitro* de las formulaciones desoxicolato y liposomal de anfotericina B frente a *Candida*. No se encontraron estudios similares en *Trichosporon*.

El perfil farmacológico y farmacocinético de los polienos, los azoles y otros fármacos determina su efectividad terapéutica frente a las distintas micosis causadas por *Trichosporon* (Bonifaz Trujillo, 2020). Para la piedra blanca, existen disponibles fungicidas tópicos con bicloruro de mercurio al 1 %, yodo (1-2) %, ácido salicílico al (5-10) % (incluso al 30 %), glutaraldehído al 2 %, azufre al 6 %, disulfuro de selenio al 2 % o clorhexidina y champús, que son más recomendados por su fácil distribución y que tienen compuestos activos como: piritona de zinc, ciclopiroxolamina y derivados de azoles (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Bonifaz Trujillo, 2020). También, el corte de los vellos infectados es curativo frente a esta patología (incluido el rasurado ante una micosis superficial muy diseminada) (Bonifaz et al., 2019; Bonifaz Trujillo, 2020).

Para el tratamiento de onicomycosis por *Trichosporon* se ha reportado el uso de itraconazol (oral, combinado con tratamiento tópico de urea al 40 %), mientras que de manera general

para las micosis superficiales por *Trichosporon* se recomienda el uso imidazoles tópicos (Bonifaz Trujillo, 2020; Rizzitelli et al., 2016).

Ante una infección que no responde al tratamiento tópico, un relapso o enfermedad superficial diseminada (que se encuentra en diferentes tipos de vello) resulta necesario el uso de tratamiento sistémico. El más recomendado para una piedra blanca que requiera tratamiento oral consiste en 100 mg diarios de itraconazol durante 15 a 30 días, pero también se reporta el uso de fluconazol (Arenas Guzmán y Torres Guerrero, 2019; Bonifaz Trujillo, 2020).

Ante una micosis invasiva por *Trichosporon* se recomienda el voriconazol como tratamiento de primera línea, y fluconazol e itraconazol en segunda instancia (Castano et al., 2021; Mehta, Nayyar, et al., 2021). También se ha sugerido el uso de anfotericina B en conjunto con voriconazol, 5-fluorocitosina o micafungina (Castano et al., 2021).

Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos

Las pruebas de susceptibilidad son necesarias para el estudio de la actividad de los antifúngicos (tanto los nuevos como preexistentes) sobre el crecimiento de los hongos y para la determinación de aislamientos resistentes a estos. Estos métodos se basan en determinar la CMI (concentración mínima inhibitoria), que es la concentración más baja de antifúngico que produce la inhibición del 50 % de crecimiento en el caso de los tratamientos fungistáticos (como azoles y 5-fluorocitosina) y del 100 % en los fungicidas (como anfotericina B), para los hongos levaduriformes (Bonifaz Trujillo, 2020; Cantón et al., 2007; Salas Campos et al., 2011).

El método de microdilución en caldo es el estándar de oro y consiste en inocular una concentración constante de hongo sobre una placa de 96 pocillos con fondo plano, que contiene antifúngico diluido en varias concentraciones con DMSO y RPMI 1640 como medio de cultivo (el término RPMI procede de las siglas en inglés *Roswell Park Memorial Institute*) (Cantón et al., 2007). Los métodos que utilizan la técnica de microdilución en caldo son los recomendados por CLSI (*Clinical Laboratory and Standard Institute*) y EUCAST (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*), cuyas diferencias se encuentran en el

Cuadro 1 (Bonifaz Trujillo, 2020; Salas Campos et al., 2011). En el caso del CLSI M27-A3, la placa se incubaba a 35°C durante 48 h (*Candida* spp.) o 72 h (*Cryptococcus* spp.) (Cantón et al., 2007).

Cuadro 1. Comparación de métodos de microdilución en caldo utilizados para el estudio de la susceptibilidad *in vitro* de levaduras frente a distintos antifúngicos.

Característica	Método de microdilución en caldo	
	CLSI	EUCAST
Hongos para los que fue estandarizado el método	<i>Candida</i> y <i>Cryptococcus</i>	Levaduras que fermentan glucosa como <i>Candida</i>
RPMI	No contiene glucosa	Suplementado con 2 % glucosa.
Lectura	Manual, se compara el tamaño del botón con el control de crecimiento.	Espectrofotométrica a 405, 450 o 530 nm.

Modificado de Bonifaz Trujillo, 2020; Cantón et al., 2007.

Los puntos de corte de resistencia o sensibilidad fueron establecidos por CLSI y EUCAST con base en ensayos clínicos *in vivo* e *in vitro* para predecir la probabilidad de éxito terapéutico de un antifúngico al realizar las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos (Bonifaz Trujillo, 2020; Cantón et al., 2007). Para estos métodos, los puntos de corte de resistencia o sensibilidad solo están definidos para candidemias y micosis orofaríngeas de pacientes VIH positivo con sus respectivos tratamientos: anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina (Bonifaz Trujillo, 2020; Cantón et al., 2007). Es decir, los puntos de cortes para determinar sensibilidad o resistencia en *Trichosporon* no están determinados en las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos de CLSI o EUCAST (Mehta, Nayyar, et al., 2021).

Otro aspecto que supone un reto para analizar la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de aislamientos clínicos de *Trichosporon* es la gran variabilidad de los resultados obtenidos

entre los distintos investigadores, en antifúngicos como la anfotericina B y el fluconazol (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016; Malacrida et al., 2021, Sprute et al., 2022). A pesar de esto, a nivel global se ha analizado la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de este hongo tomando como referencia los puntos de corte establecidos para *Candida*, y en conjunto con los resultados obtenidos en distintos estudios epidemiológicos; se ha podido dilucidar los patrones de susceptibilidad de este hongo frente a los distintos antifúngicos comercialmente disponibles (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016; Malacrida et al., 2021, Sprute et al., 2022).

Ante una micosis invasiva por *Trichosporon*, no se recomienda la monoterapia con 5-fluorocitosina o equinocandinas, por su limitada actividad antimicrobiana contra este hongo que se observado en los análisis *in vitro* (Mehta, Nayyar, et al., 2021). Los aislamientos de *Trichosporon* muestran CMIs altas frente a equinocandinas (CMIs entre 4–128 µg/ml) y 5-fluorocitosina (CMIs mayores 16 µg/ml) y se consideran poco susceptibles frente a estos fármacos (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016; Mehta, Nayyar, et al., 2021).

Se ha reportado de manera *in vitro* que los aislamientos de *T. asahii* son altamente susceptibles a los triazoles (especialmente al voriconazol) y muestran una susceptibilidad variable frente a la anfotericina B, e incluso frente a algunos triazoles como el fluconazol (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016; Guo et al., 2011; Malacrida et al., 2021; Mehta, Nayyar, et al., 2021; Sprute et al., 2022). La literatura científica expone que el perfil de susceptibilidad de *T. inkin* y *T. mucoides/T. dermatis* no exhibe tanta variabilidad fenotípica frente a anfotericina B (de Almeida Júnior and Hennequin 2016). Por otra parte, los resultados obtenidos de PSA para *T. mucoides/dermatis* frente a fluconazol han resultado tener un rango alto entre las diferentes investigaciones (0,25 mg/L a 7 mg/L). Mientras que el perfil de susceptibilidad de *T. inkin* frente al fluconazol se encuentra en (2 a 2,74) mg/L (de Almeida Júnior and Hennequin 2016). Hasta la fecha, no se han realizado estudios de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de aislamientos clínicos de *Trichosporon* obtenidos de micosis en Costa Rica, por lo que se desconoce su CMI frente a los distintos antifúngicos.

Metodología

1.1 Aislamientos de *Trichosporon*

Se analizaron 17 aislamientos de *Trichosporon* preservados en la Micoteca de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (VI-B7732) que fueron depositados entre los años 1995 y 2021. Los datos demográficos de estos aislamientos se encuentran en el Cuadro 4 (Anexos). Los ejemplares se mantuvieron en tubos con MSG a temperatura ambiente (20 – 30 °C).

1.2 Identificación de los aislamientos de *Trichosporon*

Se evaluó la pureza de los ejemplares y su respectiva identificación hasta el taxón de género mediante el análisis de las características macroscópicas y microscópicas de los ejemplares en MSG. Las características macroscópicas se observaron de manera visual directamente del tubo (descripción de la morfología colonial al anverso y al reverso) y las características microscópicas mediante la observación en lactofenol azul con microscopía de luz a 40X (Gross y Salas, 2012).

Seguidamente, los aislamientos fueron subcultivados en agar urea de Christensen para evaluar la producción de ureasa (Gross y Salas, 2012). Finalmente, los aislamientos de *Trichosporon* se identificaron hasta el taxón de especie con los equipos VITEK®2 (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, Francia) y Maldi Biotyper (Bruker® Daltonics, Alemania).

1.3 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos: anfotericina B, voriconazol, itraconazol y fluconazol.

Se utilizó el método de microdilución en medio líquido para determinar la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B, voriconazol, itraconazol y fluconazol. La CMI se determinó de acuerdo con las especificaciones del Método de Microdilución en Caldo M27-A3 para hongos levaduriformes de la CLSI mencionado por Cantón et al., 2007. Como controles se utilizaron cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258.

Las concentraciones finales de los antifúngicos fueron: 16 – 0,03 µg/mL para anfotericina B, itraconazol y voriconazol (Royal Pharm, Hangzhou, China), 128 – 0,25 µg/mL para fluconazol (Laboratorios Stein SA, Costa Rica). Se usó el diluyente DMSO (Sigma Chemicals, Co., St. Louis, Mo, EEUU). Para la preparación del inóculo se partieron de subcultivos de *Trichosporon* en MSG de 24 h incubados a temperatura ambiente. A partir de cada aislamiento, se preparó una suspensión hasta la turbidez de 0,5 en escala McFarland en solución salina estéril 0,85 %. Seguidamente, se realizó una dilución 1/1000 con RPMI, que se usó para inocular las microplacas con cada antifúngico. Las placas se incubaron a 35 °C sin agitación durante 48 a 72 horas o hasta que se observara crecimiento en el pocillo control.

Luego de la incubación, se determinó la CMI mediante una lectura visual del tamaño del botón de levaduras. La CMI es la concentración más baja que produce la inhibición del 50 % de crecimiento en el caso de los tratamientos fungistáticos y del 100 % en los fungicidas, comparado con el botón observado en el control de crecimiento.

Para analizar los resultados obtenidos se utilizó el programa SPSS para Windows, versión 21 (SPSS Inc., Chicago, III, EEUU). Se determinó la media geométrica, el rango de las CMIs y para cada antifúngico: la CMI₅₀ y la CMI₉₀ (que corresponden a la concentración mínima de antifúngico que inhibe el crecimiento del 50 % y 90 %; respectivamente, de las cepas analizadas). Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar los valores de las CMIs entre los diferentes antifúngicos.

Resultados

Identificación bioquímica y proteómica

Se determinó que el 70,6 % de los 17 aislamientos analizados eran *T. asahii* ($n = 12$). También, se identificó un aislamiento de *T. mucoides* y otro (del género *Trichosporon*) que ninguno de los métodos pudo clasificar a nivel de especie. Por otro lado, dos de los aislamientos, depositados como *Trichosporon* sp., presentaron micelio sumergido en el MSG y se caracterizaron dentro del género *Candida*. Un aislamiento, también previamente identificado como *Trichosporon* sp., presentó colonias mucoides, de aspecto lechoso, no pigmentadas, al cual se le observaron blastosporas mediante el microscopio; este se identificó dentro del género *Cryptococcus* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Identificación morfológica, bioquímica y proteómica de aislamientos clínicos caracterizados previamente como *Trichosporon* spp. en laboratorios clínicos de Costa Rica ($n = 17$).

Número de aislamientos	Identificación morfológica	Prueba urea de Christensen	Identificación (VITEK®2 y MALDI-TOF)	Identificación propuesta
12	<i>Trichosporon</i> sp.	Positivo	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
1	<i>Trichosporon</i> sp.	Positivo	<i>Trichosporon</i> sp. (especie no identificada)	<i>Trichosporon</i> sp. (especie no identificada)
1	<i>Trichosporon</i> sp.	Positivo	<i>T. mucoides</i>	<i>T. mucoides</i>
1	Levadura	Positivo	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
1	<i>Candida</i> sp.	Negativo	<i>Candida famata</i>	<i>Candida famata</i>
1	<i>Candida</i> sp.	Negativo	<i>Candida ciferii</i>	<i>Candida ciferii</i>

Distribución anatómica

De los 12 aislamientos identificados como *T. asahii*, seis fueron aislados de uñas en los miembros inferiores o superiores, tres se detectaron en el cabello y se obtuvo un aislamiento de cada una de las siguientes muestras: biopsia de hígado, aspirado endotraqueal y orina. La cepa de *T. mucoides* se obtuvo de una secreción peritoneal; y la de *Trichosporon* sp. (especie no identificada) de un paciente con piedra blanca (Cuadro 4, Anexos).

Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos (PSA)

Los aislamientos de *Trichosporon* fueron susceptibles a los distintos antifúngicos analizados. Es decir, se observó una inhibición total o parcial *in vitro* del crecimiento de los aislamientos de *Trichosporon* frente a la anfotericina B, al fluconazol, al itraconazol y al voriconazol (Cuadro 3).

El grado de susceptibilidad fue variable, ya que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las CMI de los antifúngicos analizados ($F = 17,864$; $gl = 3$; $p < 0,001$). Al realizar la prueba post Hoc de Tukey los antifúngicos fueron agrupados en dos grupos: en el primero se colocó a la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol; y en el segundo grupo al fluconazol; donde se presentaron las CMI más altas. Un aislamiento presentó una CMI mayor que $1 \mu\text{g/mL}$ en anfotericina B ($\text{CMI} = 1,50 \mu\text{g/mL}$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Patrones de susceptibilidad de 14 aislamientos clínicos de *Trichosporon* spp., provenientes de diversos sitios anatómicos.

Antifúngico	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)			
	Promedio CMI ± DE	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Anfotericina B	0,53 ± 0,42	0,06 – 1,50	0,38	1,25
Fluconazol	1,98 ± 1,46	0,25 – 4,00	2,00	4,00
Itraconazol	0,291 ± 0,15	0,03 – 0,50	0,25	0,50
Voriconazol	0,07 ± 0,04	0,03 – 0,13	0,06	0,13

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las CMI de los antifúngicos analizados dependiendo del tipo de presentación clínica (micosis superficiales y sistémicas) (anfotericina B [t = -0,396; gl = 12; p = 0,699], fluconazol [t = -0,151; gl = 12; p = 0,883], itraconazol [t = 0,665; gl = 12; p = 0,518] y voriconazol [t = -0,043; gl = 12; p = 0,966]). El número de aislamientos de *Trichosporon* no *asahii* fue escaso, por lo que no se analizaron diferencias estadísticas de la PSA entre especies.

Discusión

Identificación bioquímica y proteómica

De los 14 aislamientos con identificación confirmada dentro del género *Trichosporon*, la especie *T. asahii* se encontró en mayor proporción, lo cual es concordante con la epidemiología global, ya que esta la especie más frecuentemente aislada de micosis invasivas causadas por *Trichosporon* y una de las principales especies del género que causan onicomycosis (Almeida Júnior y Hennequin, 2016; Francisco et al., 2019; Mehta, Nayyar, et al., 2021; Montoya y González, 2014).

A pesar de que, los métodos utilizados en este trabajo (VITEK[®]2 YST y Maldi Biotyper) permiten identificar a un menor número de las especies de *Trichosporon*, en comparación con análisis moleculares o genómicas, se considera que la identificación a nivel de especie realizada en este trabajo es válida, ya que los equipos VITEK[®]2 y Maldi Biotyper cuentan con procedimientos estandarizados para la identificación de levaduras de importancia médica, que fueron aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Ahmad et al., 2005; bioMérieux, 2018; Chagas-Neto et al., 2009; Colombo et al., 2011; de Figueiredo et al., 2014; Guo et al., 2011, 2019; Patel, 2019; U.S. Food and Drug Administration, 2017). Además, estos equipos se cuentan con parámetros cuantitativos (como el *log score* y el nivel de confianza) que permitieron reportar la especie de los aislamientos analizados en este trabajo con un alto nivel de confianza (de Figueiredo et al., 2014; Parashar et al., 2022).

No obstante, el alcance de la base de datos actualmente disponibles en los equipos de VITEK[®]2 y Maldi Biotyper limita el número de especies que se pudieron identificar; de hecho, un aislamiento de *Trichosporon* no pudo ser identificado a nivel de especie (Cuadro 2). Posiblemente, esto se deba a la presencia de una cepa de *T. asahii*, *T. inkin* o *T. mucoides* que exprese un fenotipo atípico; o a una especie de *Trichosporon* no incluida en las bases de datos y con un fenotipo discrepante al de estas tres especies. Por lo tanto, se recomienda que en estudios posteriores también se utilicen técnicas moleculares y genómicas.

Además de los sistemas automatizados de identificación, la prueba de la ureasa resultó de gran relevancia en este trabajo para confirmar el género de los aislamientos. *Trichosporon* y

Cryptococcus son urea positivos, mientras que *Candida* es urea negativo (Colombo et al., 2011; Gross y Salas, 2012; Pérez et al., 2002). Esta información concuerda con los fenotipos observados durante el trabajo experimental (Cuadro 2).

Distribución anatómica

La mayoría de los aislamientos analizados de *Trichosporon* se aislaron a partir de onicomycosis y solo una se obtuvo a partir de un urocultivo. Esta distribución anatómica es atípica, ya que, la orina es la principal muestra de la cual se aísla a este patógeno, precedida por la sangre (Ahmad et al., 2005; Arabatzis et al., 2014; Colombo et al., 2011; Francisco et al., 2019; Li et al., 2020). Mientras que, el sistema tegumentario representa un bajo porcentaje de las muestras de donde se aísla a *Trichosporon* (Francisco et al., 2019, 2021; Li et al., 2020).

Las cepas disponibles para este estudio fueron depositadas en la Micoteca de la Facultad de Microbiología por funcionarios del laboratorio clínico que tomaron muestras de lesiones superficiales (piel y uñas), principalmente. También, algunos aislamientos se obtuvieron de micosis superficiales y sistémicas, que fueron enviados por profesionales en Microbiología de manera altruista. Por lo tanto, no es posible dilucidar si la distribución atípica observada concuerda realmente con el panorama nacional, o si es producto de analizar una muestra sesgada.

Dos de los aislamientos que se aislaron a partir de onicomycosis, fueron depositados como *Trichosporon* sp., y se identificaron como *C. famata* y *C. ciferii* en el presente trabajo. Además, se detectó una caracterización incorrecta de *C. neoformans*. Si bien, se desconocen los métodos de identificación de estos aislamientos en los laboratorios clínicos; es importante recalcar que, en nuestro país, los análisis pertinentes a la Micología Médica tienen grandes oportunidades de mejora; en comparación con los demás exámenes realizados en los laboratorios clínicos del país (Céspedes, 2022). Las tres identificaciones erróneas evidenciadas; en conjunto con el posible sub-registro de algunas infecciones urinarias causadas por *Trichosporon*, no son situaciones excepcionales. Por el contrario, probablemente ocurren con bastante frecuencia.

Un falso negativo puede ocurrir cuando se descarta un crecimiento microbiano en un corto lapso (generalmente, los hongos requieren un tiempo de incubación mayor que el de las bacterias), cuando el agente etiológico fúngico que crece en los medios de cultivo es catalogado como un contaminante o como parte de una eubiosis, o cuando no se disponen de medios de cultivo que permitan identificar un aislamiento fúngico que está siendo enmascarado por un agente etiológico bacteriano o un contaminante (Rezusta López et al., 2007, Gross y Salas, 2012). Por el contrario, un falso positivo de una micosis por *Trichosporon*, como el que ocurrió en las identificaciones erróneas, generalmente sucede cuando no se logra observar alguna estructura característica de un género fúngico, esta situación puede reducirse al utilizar varias técnicas de identificación de forma simultánea (Pérez et al., 2002; Raja et al., 2017). Ambos escenarios limitan la resolución del cuadro clínico en los pacientes, en el primero no se identifica al hongo por lo que posiblemente no se administre un tratamiento antifúngico; mientras que en el segundo; se programa un esquema terapéutico en función de un agente etiológico incorrecto.

Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos (PSA)

Actualmente, no se han definido puntos de corte para determinar si un aislamiento de *Trichosporon* es sensible o resistente a los diferentes antifúngicos (Mehta, Chander, et al., 2021; Sprute et al., 2022). Esto limita la utilidad de estos ensayos para predecir el éxito terapéutico cuando se analizan aislamientos clínicos de *Trichosporon* (Sprute et al., 2022). Sin embargo, los procedimientos descritos por la CLSI y/o EUCAST permiten obtener datos epidemiológicos para monitorear la susceptibilidad *in vitro* a antifúngicos, detectar posibles cambios en el tiempo y además, brindan resultados relevantes para el diseño de esquemas de tratamiento (Francisco et al., 2019; Hoenigl et al., 2022; Iturrieta-González et al., 2014; Mehta, Nayyar, et al., 2021).

En la presente investigación, mediante la prueba estadística post Hoc de Tukey se obtuvieron dos grupos de antifúngicos estadísticamente diferentes: en el primero se colocó a la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol; y en el segundo grupo al fluconazol; donde se presentaron las CMI's más altas.

Se ha reportado un patrón de susceptibilidad en otros países similar al observado en este trabajo. En China, se analizaron 48 aislamientos clínicos de *Trichosporon* y se reportó que el voriconazol, el itraconazol y la anfotericina B fueron los antifúngicos con las CMI más bajas (La media geométrica de CMI para voriconazol fue 0,12 µg/ml; para el itraconazol: 0,66 µg/ml; y para la anfotericina B: 1,09 µg/ml) (Guo et al., 2011). Mientras que, en el tratamiento con fluconazol se obtuvieron las CMI más altas (Media geométrica: 3,97 µg/ml) (Guo et al., 2011).

En Grecia, un estudio determinó un fenotipo de susceptibilidad similar al obtenido. Se realizaron pruebas de susceptibilidad a antifúngicos a 42 aislamientos clínicos de *T. asahii*. Las CMI de anfotericina B, itraconazol, posaconazol y voriconazol fueron estadísticamente equivalentes; y menores a las obtenidas para el fluconazol (Arabatzis et al., 2014). Además, en la India se reportó un patrón de susceptibilidad de *Trichosporon* diferente al obtenido en este trabajo, ya que los antifúngicos con CMI bajas fueron voriconazol y posaconazol, y el grupo de antimicrobianos con CMI altas incluyó a la anfotericina B y el fluconazol (Mehta, Chander, et al., 2021).

Los aislamientos analizados de *Trichosporon* presentaron una alta susceptibilidad frente a anfotericina B. El perfil de susceptibilidad de *Trichosporon* frente este antifúngico es ampliamente heterogéneo y variable a nivel global (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016; Guo et al., 2011; Malacrida et al., 2021; Sprute et al., 2022). Por ejemplo, se han reportado cepas de *Trichosporon* con una susceptibilidad a la anfotericina B similar a la obtenida en este trabajo, en algunos países de Asia y Norteamérica (China, Estados Unidos y Tailandia); donde la CMI₅₀ fue igual o menor a 1 µg/ml (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016; Guo et al., 2011, 2019; Mekha et al., 2010; Paphitou et al., 2002; Thompson et al., 2009; Tsai et al., 2012). Mientras que, también, se han evidenciado cepas de *Trichosporon* con una baja susceptibilidad a la anfotericina B en Latinoamérica y Europa (Brasil, México y Grecia); donde la CMI₅₀ fue mayor a 2 µg/ml (Arabatzis et al., 2014; de Oliveira Silva et al., 2008; Iturrieta-González et al., 2014; Lemes et al., 2010; Montoya et al., 2015). A pesar de que los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la anfotericina B tiene una alta actividad antifúngica contra *Trichosporon*, esta heterogeneidad fenotípica reportada por otros autores también debe ser considerada en el diseño de esquemas de tratamiento (Sprute et al., 2022).

Respecto a los hallazgos obtenidos con los azoles, el voriconazol fue el antifúngico en donde se observaron los valores más bajos de CMI₅₀, CMI₉₀, y media geométrica (Cuadro 3). Esta evidencia sugiere que el voriconazol podría ser el antifúngico más efectivo contra las micosis sistémicas causadas por *Trichosporon* a nivel nacional; lo cual concuerda con los resultados *in vitro* e *in vivo* de otros investigadores, quienes recomiendan el voriconazol como primera línea de tratamiento ante una micosis sistémica causada por este hongo (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016; Foster et al., 2018; Malacrida et al., 2021; Sprute et al., 2022). Es importante mencionar que el uso combinado de voriconazol con anfotericina B no produce una mejoría clínica estadísticamente superior a la monoterapia con algunos de estos antifúngicos (Li et al., 2020).

En este trabajo se obtuvo una CMI₅₀ de 0,60 µg/ml del voriconazol frente a los 14 aislamientos de *Trichosporon*, lo cual es concordante con otras investigaciones a nivel mundial; quienes reportan un resultado igual o menor al obtenido en este trabajo (Francisco et al., 2019; Hazirolan et al., 2013; Thompson et al., 2009).

El itraconazol fue agrupado dentro del grupo de antifúngicos con alta actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* contra *Trichosporon* y para este se obtuvo una CMI₅₀ de 0,25 µg/ml (Cuadro 3). La susceptibilidad de los aislamientos analizados de *Trichosporon* frente al itraconazol es mayor a la reportada por otros autores a nivel global; quienes reportaron valores de CMI₅₀ iguales o mayores a 1 µg/ml (Guo et al., 2019; Metin et al., 2005; Wolf et al., 2001). Las cepas de *Trichosporon* presentan una susceptibilidad intermedia al itraconazol; que es menor para el voriconazol y mayor ante otros antifúngicos (como las equinocandinas) (Hazirolan et al., 2013; Mehta, Nayyar, et al., 2021; Metin et al., 2005). Por esta razón en la literatura, se ha sugerido al itraconazol como segunda línea de tratamiento frente a una micosis causada por *Trichosporon* (Castano et al., 2021).

El fluconazol fue el antifúngico donde se obtuvieron las CMIs más altas. Sin embargo, los puntos de corte del CLSI son mayores para el fluconazol; en comparación con otros agentes antimicrobianos (Cantón et al., 2007), por lo que estos valores altos de CMIs no indican que la susceptibilidad de los aislamientos analizados de *Trichosporon* frente al fluconazol sea menor que a la de los otros antifúngicos estudiados, y tampoco sugieren que, la administración de este antifúngico frente a una micosis por *Trichosporon* logre un menor

éxito terapéutico. En realidad, los resultados obtenidos indican que los aislamientos analizados de *Trichosporon* presentan una alta susceptibilidad al fluconazol; a pesar de que en este antifúngico se hayan determinado las CMI_s más altas. De hecho, el fluconazol es uno de los tratamientos más frecuentemente utilizados ante una micosis sistémica causada por *Trichosporon* (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016). Además, se han logrado resultados favorables en pacientes al utilizarlo de manera conjunta con antifúngicos como anfotericina B o voriconazol (Castano et al., 2021; K. Itoh et al., 2021).

Algunas investigaciones que realizaron PSA a aislamientos clínicos de *Trichosporon* también han obtenido las CMI_s más altas en el fluconazol; cuando se compara con otros triazoles y con anfotericina B (Arabatzis et al., 2014; Francisco et al., 2021; Guo et al., 2019; Wolf et al., 2001). Sin embargo, también se han reportado cepas de *Trichosporon* con una susceptibilidad similar entre el fluconazol, el itraconazol o la anfotericina B (Mehta, Nayyar, et al., 2021).

Para este hongo también se reporta el fenómeno de heterogeneidad fenotípica frente al fluconazol (es decir, CMI_s muy variables) (de Almeida Júnior y Hennequin, 2016; Malacrida et al., 2021). De hecho, en la presente investigación el fluconazol fue el antifúngico donde se obtuvo la mayor desviación estándar (Cuadro 3).

En los resultados obtenidos se determinó que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las CMI_s de los antifúngicos analizados dependiendo del tipo de presentación clínica. Esta información es congruente con lo reportado por Francisco y colaboradores (2021), quienes analizaron 284 muestras clínicas de *Trichosporon* en Brasil y no encontraron diferencias estadísticamente significativas de las PSA entre los diferentes sitios anatómicos.

Los aislamientos analizados de *Trichosporon* muestran un perfil de susceptibilidad a antifúngicos similar al de levaduras del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* aisladas en territorio nacional. Las cepas analizadas de *Trichosporon* en este trabajo tuvieron una alta susceptibilidad al fluconazol, en donde se determinó una CMI₅₀ de 2,00 µg/mL y un rango CMI de (0,25 – 4,00) µg/mL (Cuadro 3). Asimismo, también se han reportado aislamientos clínicos del complejo *C. neoformans/C. gattii* obtenidos en Costa

Rica (n = 74), sensibles al fluconazol (CMI \leq 8 $\mu\text{g/mL}$), y con una CMI₅₀ de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ frente al mismo (Jaikel-Viquez et al., 2018).

Por el contrario, se han evidenciado cepas de *Candida parapsilosis* obtenidas en nuestro país (n = 69) con una CMI₅₀ de 1,50 $\mu\text{g/mL}$ frente al fluconazol; en donde el 29 % de los aislamientos fueron resistentes a este antifúngico (CMI $>$ 8 $\mu\text{g/mL}$) (Villalobos-Castro et al., 2020). En el estudio de Villalobos-Castro et al. (2020), ningún aislamiento tuvo una CMI mayor a 1 $\mu\text{g/mL}$ frente a la anfotericina B, mientras que en la presente investigación se detectó una cepa de *Trichosporon* con esta característica (Cuadro 3).

La susceptibilidad de los aislamientos analizados de *Trichosporon* frente al itraconazol es notablemente mayor a la reportada en cepas de *Fusarium solani* obtenidas en nuestro país (n = 29) (Sequeira-Oviedo et al., 2017). Las cepas analizadas de *Trichosporon* en este trabajo mostraron una CMI₅₀ de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ frente al itraconazol. Mientras que, a estos aislamientos de *F. solani* provenientes de onicomicosis se les reportó una CMI₅₀ mayor a 16 $\mu\text{g/mL}$ frente a este mismo antifúngico (Sequeira-Oviedo et al., 2017).

Conclusiones

En los aislamientos clínicos estudiados, se identificaron a *T. asahii*, *T. mucoides* y una cepa de *Trichosporon* que no pudo ser identificada a nivel de especie como los agentes etiológicos de algunas micosis superficiales y sistémicas en la población costarricense. La especie predominante fue *T. asahii*, lo cual concuerda con la epidemiología global.

Se evidenció una identificación errónea de tres aislamientos clínicos, que es un hallazgo de relevancia médica, ya que este incidente puede limitar la resolución del cuadro clínico en los pacientes de nuestro país que presentan una micosis por hongos diferentes a *Trichosporon* spp.

Los aislamientos analizados de *Trichosporon* presentaron una susceptibilidad alta a la anfotericina B, al fluconazol, al itraconazol y al voriconazol. A pesar de que no se cuentan con puntos de corte, es posible afirmar que la resistencia de los aislamientos estudiados a estos antifúngicos no debería representar un problema de gran importancia clínica.

El voriconazol es el antifúngico que podría tener mayor efectividad terapéutica frente a una micosis causada por *Trichosporon* en los pacientes de nuestro país.

Referencias

- Ahmad, S., Al-Mahmeed, M., y Khan, Z. U. (2005). Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. *Journal of Medical Microbiology*, 54(7), 639–646. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45972-0>
- Ajello, L. (1994). Milestones in the History of Medical Mycology. The Superficial Mycoses. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 35(1), 75–82. <https://doi.org/10.3314/jjmm.35.75>
- Allen, D., Wilson, D., Drew, R., y Perfect, J. (2015). Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(6), 787–798. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1032939>
- Ali, G. A., Husain, A., Salah, H., y Goravey, W. (2021). *Trichosporon asahii* fungemia and COVID-19 co-infection: An emerging fungal pathogen; case report and review of the literature. *IDCases*, 25, e01244. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01244>
- Arabatzis, M., Abel, P., Kanellopoulou, M., Adamou, D., Alexandrou-Athanasoulis, H., Stathi, A., Platsouka, E., Milioni, A., Pangalis, A., y Velegraki, A. (2014). Sequence-based identification, genotyping and EUCAST antifungal susceptibilities of *Trichosporon* clinical isolates from Greece. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(8). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12501>
- Arenas Guzmán, R., y Torres Guerrero, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada* (6ª ed.). McGraw-Hill.
- Arendrup, M. C., Boekhout, T., Akova, M., Meis, J. F., Cornely, O. A., y Lortholary, O. (2014). ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 76–98. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12360>
- Ballesté, R., Mousqués, N., y Gezuele, E. (2003). Onicomycosis. Revisión del tema. *Revista Médica Del Uruguay*, 19(2), 93–106. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902003000200003&lng=es&esytlng=es

- Benelli, J. L., Basso, R. P., Grafulha, T. W., Poester, V. R., Munhoz, L. S., Martins, K. B., Zogbi, H. E., Von Groll, A., Severo, C. B., Stevens, D. A., y Xavier, M. O. (2022). Fungal Bloodstream Co-infection by *Trichosporon asahii* in a COVID-19 Critical Patient: Case Report and Literature Review. *Mycopathologia*, 187(4), 397–404. <https://doi.org/10.1007/s11046-022-00637-6>
- Bennett, J. E., Dolin, R., y Blaser, M. J. (2015). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. En Mandell, G. L., Bennett, J. E., y Dolin, R. (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Vols. 1–2). [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(10\)70089-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(10)70089-x)
- Berkow, E. L., y Lockhart, S. R. (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and Drug Resistance*, 10, 237–245. <https://doi.org/10.2147/IDR.S118892>
- bioMérieux. (2018). *Tarjetas de identificación VITEK®2 YST*. BioMérieux España S.A. Recuperado el 15 de Enero de 2023, de <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/tarjetas-de-identificacion-de-vitekr2-yst>
- bioMérieux SA. (2011). *ID 32C. Identification system for yeasts*. Recuperado el 21 de Enero de 2023, de https://www.mediray.co.nz/media/15793/om_biomerieux_test-kits_ot-32200_package_insert-32200.pdf
- Boekhout, T., Fonseca, Á., Sampaio, J. P., Bandoni, R. J., Fell, J. W., y Kwon-Chung, K. J. (2011). Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. En Kurtzman, C. P., Fell, J. W y Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts: A taxonomic study* (5^a ed, Vol I, pp. 1339-1372). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00100-2>
- Bonifaz, A., Tirado-Sánchez, A., Araiza, J., Rodríguez-Leviz, A., Guzmán-Sánchez, D., Gutiérrez-Mendoza, S., y Castrejón, L. (2019). White Piedra: Clinical, Mycological, and Therapeutic Experience of Fourteen Cases. *Skin Appendage Disorders*, 5(3), 135–141. <https://doi.org/10.1159/000493374>
- Bonifaz Trujillo, A. (2020). *Micología Médica Básica*. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.

- Cantón, E., Martín, E., y Espinel-Ingroff, A. (2007). Capítulo 15: Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). En Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., Rubio-Calvo, MC. (Eds.), *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*. Bilbao, España. <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
- Castano, G., Yarrarapu, S. N. S., y Mada, P. K. (2021). *Trichosporonosis*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Recuperado el 02 de Febrero de 2022, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482477/>
- Cavassin, F. B., Baú-Carneiro, J. L., Vilas-Boas, R. R., & Queiroz-Telles, F. (2021). Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infectious Diseases and Therapy*, 10(1), 115–147. <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00382-7>
- Céspedes, V. (2022). Dermatofitos: una revisión en la literatura desde la perspectiva del laboratorio clínico [Tesis para optar por el grado y título de Especialista en Micología Médica, Universidad de Costa Rica]. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/87576>
- Chagas-Neto, T. C., Chaves, G. M., Melo, A. S. A., y Colombo, A. L. (2009). 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 1074–1081. <https://doi.org/10.1128/JCM.01614-08>
- Cho, O., Matsukura, M., y Sugita, T. (2015). Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. *International Journal of Infectious Diseases*, 39, 87–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.09.009>
- Colín Garnica, J., Meza-Robles, A., García Abundis, I., Vega Sánchez, D. C., Gutiérrez Palomares, J., y Arenas Guzmán, R. (2018). Onicomicosis por *Trichosporon* spp. Estudio clínico y micológico de 18 casos. *Dermatología Cosmética, Médica y*

- Quirúrgica*, 16(4), 274–277. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm184e.pdf>
- Colombo, A. L., Padovan, A. C. B., y Chaves, G. M. (2011). Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 682–700. <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-11>
- Corrêa-Junior, D., Andrade, I. B. de, Alves, V., Araújo, G. R. de S., y Frases, S. (2022). Clinical Challenges of Emerging and Re-Emerging Yeast Infections in the Context of the COVID-19 Pandemic. *Microorganisms*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112223>
- Cronyn, V., Howard, J., Chiang, L., Le, L., Tims-Cook, Z., y Gertz, A. M. (2021). *Trichosporon asahii* Urinary Tract Infection in a Patient with Severe COVID-19. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2021, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2021/6841393>
- Davies, G. E., y Thornton, C. R. (2014). Differentiation of the emerging human pathogens *Trichosporon asahii* and *Trichosporon asteroides* from other pathogenic yeasts and moulds by using species-specific monoclonal antibodies. *PloS One*, 9(1), e84789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084789>
- de Almeida, J. N., Favero Gimenes, V. M., Francisco, E. C., Machado Siqueira, L. P., Gonçalves de Almeida, R. K., Guitard, J., Hennequin, C., Colombo, A. L., Benard, G., y Rossi, F. (2017). Evaluating and Improving Vitek MS for Identification of Clinically Relevant Species of *Trichosporon* and the Closely Related Genera *Cutaneotrichosporon* and *Apiotrichum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(8), 2439–2444. <https://doi.org/10.1128/JCM.00461-17>
- de Almeida Júnior, J. N., y Hennequin, C. (2016). Invasive *Trichosporon* Infection: a Systematic Review on a Re-emerging Fungal Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01629>
- de Figueiredo, D. S. Y., de Almeida, J. N., Motta, A. L., Castro e Silva, D. M., Szeszs, M. W., y Del Negro, G. M. B. (2014). Evaluation of VITEK 2 for discriminating *Trichosporon* species: misidentification of *Trichosporon* non-*T. asahii*. *Diagnostic*

Microbiology and Infectious Disease, 80(1), 59–61.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.017>

de Magalhães Lima, K., de de Melo Rêgo, R., y Montenegro, S. (2007). Diagnósticos Clínicos e Laboratoriais das Onicomicoses. *News Lab*, 184–196.
<https://www.saudedireta.com.br/docsupload/1340450173art02.pdf>

de Oliveira Silva, R. B., Fusco-Almeida, A. M., Matsumoto, M. T., Baeza, L. C., Benaducci, T., y Mendes-Giannini, M. J. S. (2008). Genetic diversity and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated of Intensive Care Units patients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 585–592. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300033>

Diddens, H., y J. Lodder. (1942). Umgrenzung Der Gattung *Trichosporon* Und Systematische Behandlung Ihrer Arten. En Diddens, H., y J. Lodder (Eds.), *Die anaskosporogenen Hefen* (Vol. II, pp. 408-471). Amsterdam: Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij.

Diniz, L. M., y Souza Filho, J. B. de. (2005). Estudo de 15 casos de piedra branca observados na Grande Vitória (Espírito Santo - Brasil) durante cinco anos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 80(1), 49–52. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962005000100007>

Donnelly, J., Chen, S., Kauffman, C., Steinbach, W. J., Baddley, J. W., Verweij, P. E., Clancy, C. J., Wingard, J. R., Lockhart, S. R., Groll, A. H., Sorrell, T. C., Bassetti, M., Akan, H., Alexander, B. D., Andes, D., Azoulay, E., Bialek, R., Bradsher, R. W., Bretagne, S., ... Pappas, P. G. (2020). Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clinical Infectious Diseases*, 71(6), 1367–1376.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciz1008>

Elewski, B. E. (1998). Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 415–429. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.415>

- Ellis, D., y Kidd, S. (2021). *Superficial Mycoses*. Mycology Online, University of Adelaide. Recuperado el 03 de Marzo de 2023, de <https://www.adelaide.edu.au/mycology/mycoses/superficial-mycoses#white-piedra>
- Ellis, D., y Kidd, S. (2022). *Trichosporon*. Mycology Online, University of Adelaide. Recuperado el 03 de Marzo de 2023, de <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/yeast-like-fungi/trichosporon>
- Escalante, K., y Ramírez, M. (2019). Epidemiological Outbreak: White piedra in eighteen girls of a disabled children's home in El Salvador. *24th World Congress of Dermatology Milan 2019*. Milán, Italia. <https://www.wcd2019milan-dl.org/abstract-book/documents/abstracts/42-tropical-dermatology/epidemiological-outbreak-white-piedra-in-2203.pdf>
- Escobar, C. M., y Zuluaga, Á. (2004). New Antifungals and their use in Dermatology. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 32(6), 231-242. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2004/mc046b.pdf>
- Fisher, D. J., Christy, C., Spafford, P., Maniscalco, W. M., Hardy, D. J., y Graman, P. S. (1993). Neonatal *Trichosporon beigeli* infection: report of a cluster of cases in a neonatal intensive care unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 12(2), 149–155. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8426774/>
- Foster, C. E., Edwards, M. S., Brackett, J., Schady, D. A., Healy, C. M., y Baker, C. J. (2018). Trichosporonosis in Pediatric Patients With a Hematologic Disorder. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 7(3), 199–204. <https://doi.org/10.1093/jpids/pix031>
- Francisco, E. C., de Almeida Junior, J. N., de Queiroz Telles, F., Aquino, V. R., Mendes, A. V. A., de Andrade Barberino, M. G. M., de Tarso O. Castro, P., Guimarães, T., Hahn, R. C., Padovan, A. C. B., Chaves, G. M., y Colombo, A. L. (2019). Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 909.e1-909.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.026>

- Francisco, E. C., de Almeida Junior, J. N., Queiroz-Telles, F., Aquino, V. R., Mendes, A. V. A., de Oliveira Silva, M., Castro, P. de T. O. e, Guimarães, T., Ponzio, V., Hahn, R. C., Chaves, G. M., y Colombo, A. L. (2021). Correlation of *Trichosporon asahii* Genotypes with Anatomical Sites and Antifungal Susceptibility Profiles: Data Analyses from 284 Isolates Collected in the Last 22 Years across 24 Medical Centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.01104-20>
- Gross, N. T, y Salas Campos, I. (2012). *Métodos diagnósticos en Micología Médica*. Editorial UCR.
- Guého, E., de Hoog, G. S., y Smith, M. T. (1992). Neotypification of the genus *Trichosporon*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 61(4), 285–288. <https://doi.org/10.1007/BF00713937>
- Guého, E., Improvisi, L., Hoog, G. S., y Dupont, B. (1994). *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses*, 37(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1994.tb00277.x>
- Guého, E., Smith, M. T., de Hoog, G. S., Billon-Grand, G., Christen, R., y van der Vegte, W. H. B. (1992). Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 61(4), 289–316. <https://doi.org/10.1007/BF00713938>
- Gunn, S. R., Reveles, X. T., Hamlington, J. D., Sadkowski, L. C., Johnson-Pais, T. L., y Jorgensen, J. H. (2006). Use of DNA Sequencing Analysis To Confirm Fungemia Due to *Trichosporon dermatis* in a Pediatric Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1175–1177. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1175-1177.2006>
- Guo, L. N., Xiao, M., Kong, F., Chen, S. C. A., Wang, H., Sorrell, T. C., Jiang, W., Dou, H. T., Li, R. Y., y Xu, Y. C. (2011). Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11), 3805–3811. <https://doi.org/10.1128/JCM.00937-11>
- Guo, L. N., Yu, S. Y., Hsueh, P. R., Al-Hatmi, A. M. S., Meis, J. F., Hagen, F., Xiao, M., Wang, H., Barresi, C., Zhou, M. L., Sybren De Hoog, G., y Xu, Y. C. (2019). Invasive infections due to *Trichosporon*: Species distribution, genotyping, and antifungal

- susceptibilities from a multicenter study in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(2). <https://doi.org/10.1128/JCM.01505-18>
- Gupta, A. K., Stec, N., Summerbell, R. C., Shear, N. H., Piguet, V., Tosti, A., y Piraccini, B. M. (2020). Onychomycosis: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(9), 1972–1990. <https://doi.org/10.1111/jdv.16394>
- Hazirolan, G., Canton, E., Sahin, S., y Arikan-Akdagli, S. (2013). Head-to-head comparison of inhibitory and fungicidal activities of fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, and isavuconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 4841–4847. <https://doi.org/10.1128/AAC.00850-13>
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hoenigl, M., Seidel, D., Sprute, R., Cunha, C., Oliverio, M., Goldman, G. H., Ibrahim, A. S., y Carvalho, A. (2022). COVID-19-associated fungal infections. *Nature Microbiology*, 7(8), 1127–1140. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01172-2>
- Hu, Z., Zhang, J., Chen, Z., Jin, Z., Leng, P., Zhou, J., y Xie, X. (2019). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric identification and antifungal susceptibility analysis of *Candida* species isolated from patients with invasive yeast infections in five university hospitals. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(1), 99–105. <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0027-0>
- Inácio, C. P., Rocha, A. P. S., Barbosa, R. do N., Oliveira, N. T., Silva, J. C., de Lima-Neto, R. G., Macêdo, D. P. C., y Neves, R. P. (2016). Experimental white piedra: a robust approach to ultrastructural analysis, scanning electron microscopy and etiological discoveries. *Experimental Dermatology*, 25(1), 79–81. <https://doi.org/10.1111/exd.12884>

- Itoh, K., Iwasaki, H., Negoro, E., Shigemi, H., Tokimatsu, I., Tsutani, H., y Yamauchi, T. (2021). Successful Treatment of Breakthrough *Trichosporon asahii* Fungemia by the Combination Therapy of Fluconazole and Liposomal Amphotericin B in a Patient with Follicular Lymphoma. *Mycopathologia*, 186(1), 113–117. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00525-x>
- Itoh, T., Hosokawa, H., Kohdera, U., Toyazaki, N., y Asada, Y. (1996). Disseminated infection with *Trichosporon asahii*. *Mycoses*, 39(5–6), 195–199. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1996.tb00124.x>
- Iturrieta-González, I. A., Padovan, A. C. B., Bizerra, F. C., Hahn, R. C., y Colombo, A. L. (2014). Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PloS One*, 9(10), e109553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109553>
- Jaikel-Viquez, D., Uribe-Lorío, L., y Gross, N. T. (2018). Tipificación molecular y susceptibilidad in vitro frente a fluconazol de aislamientos clínicos costarricenses del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. *Revista Panamericana de Enfermedades Infecciosas*, 1(1), 12–20. <https://revistas.utp.edu.co/index.php/panamericana/article/view/19091>
- Kuchi Bhotla, H., Balasubramanian, B., Meyyazhagan, A., Pushparaj, K., Easwaran, M., Pappusamy, M., Alwin Robert, A., Arumugam, V. A., Tsibizova, V., Msaad Alfalih, A., Aljowaie, R. M., Saravanan, M., y Di Renzo, G. C. (2021). Opportunistic mycoses in COVID-19 patients/survivors: Epidemic inside a pandemic. *Journal of Infection and Public Health*, 14(11), 1720–1726. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.010>
- Lee, P., y Goldman, D. (2021). Cryptococcosis and other rare invasive yeasts infections. In *Pediatric Transplant and Oncology Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/c2017-0-02892-6>
- Lemes, R. M. L., Lyon, J. P., Moreira, L. M., y Resende, M. A. de. (2010). Antifungal susceptibility profile of *Trichosporon* isolates: correlation between CLSI and estest methodologies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 310–315. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200008>

- Li, H., Guo, M., Wang, C., Li, Y., Fernandez, A. M., Ferraro, T. N., Yang, R., y Chen, Y. (2020). Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past 23 years. *Epidemiology and Infection*, *148*, E169. <https://doi.org/10.1017/S0950268820001624>
- Liu, X.-Z., Wang, Q.-M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A. V., Lumbsch, H. T., Millanes, A. M., Wedin, M., Yurkov, A. M., Boekhout, T., y Bai, F.-Y. (2015). Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Studies in Mycology*, *81*(1), 85–147. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.001>
- Magalhães, A. R., Nishikawa, M. M., Mondino, S. S., Macedo, H. W., Rocha, E. M., y Baptista, A. R. (2016). *Trichosporon* isolation from human ungueal infections: is there a pathogenic role? *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *91*(2), 173–179. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164632>
- Malacrida, A. M., Salci, T. P., Negri, M., y Svidzinski, T. I. (2021). Insight into the antifungals used to address human infection due to *Trichosporon* spp.: a scoping review. *Future Microbiology*, *16*(16), 1277–1288. <https://doi.org/10.2217/fmb-2021-0048>
- Maldonado, N., Robledo, C., y Robledo, J. (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. <https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>
- Matin, M. M., Matin, P., Rahman, Md. R., ben Hadda, T., Almalki, F. A., Mahmud, S., Ghoneim, M. M., Alruwaily, M., y Alshehri, S. (2022). Triazoles and Their Derivatives: Chemistry, Synthesis, and Therapeutic Applications. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.864286>
- Mehta, V., Chander, J., Gulati, N., Singla, N., Vasdeva, H., Sardana, R., y Pandey, A. K. (2021). Epidemiological profile and antifungal susceptibility pattern of *Trichosporon* species in a tertiary care hospital in Chandigarh, India. *Current Medical Mycology*, *7*(1), 19–24. <https://doi.org/10.18502/CMM.7.1.6179>

- Mehta, V., Nayyar, C., Gulati, N., Singla, N., Rai, S., y Chandar, J. (2021). A Comprehensive Review of *Trichosporon* spp.: An Invasive and Emerging Fungus. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.17345>
- Mekha, N., Sugita, T., Ikeda, R., Nishikawa, A., Autthateinchai, R., Poonwan, N., y Sawanpanyalert, P. (2010). Genotyping and Antifungal Drug Susceptibility of the Pathogenic Yeast *Trichosporon asahii* Isolated from Thai Patients. *Mycopathologia*, 169(1), 67–70. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9225-5>
- Mendoza, M., y Rico, M. E. (2011). *Trichosporon* spp como agente causal de onicomicosis. *Kasmera*, 39(1), 26–30. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222011000100004
- Metin, D. Y., Hilmioglu-polat, S., Hakim, F., Inci, R., y Tumbay, E. (2005). Evaluation of the Microdilution, Etest and Disk Diffusion Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Clinical Strains of *Trichosporon* spp. *Journal of Chemotherapy*, 17(4), 404–408. <https://doi.org/10.1179/joc.2005.17.4.404>
- Montagna, M. T., Lovero, G., Coretti, C., de Giglio, O., Martinelli, D., Bedini, A., Delia, M., Rosato, A., Codeluppi, M., & Caggiano, G. (2014). In vitro activities of amphotericin B deoxycholate and liposomal amphotericin B against 604 clinical yeast isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 63(Pt 12), 1638–1643. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.075507-0>
- Montoya, A. M., y González, G. M. (2014). *Trichosporon* spp.: an emerging fungal pathogen. *Medicina Universitaria*, 16(62), 37-43. <https://www.elsevier.es/en-revista-medicina-universitaria-304-articulo-trichosporon-spp-an-emerging-fungal-X1665579614283703>
- Montoya, A. M., Sánchez González, A., Palma-Nicolás, J. P., Gómez-Treviño, A., González, J. G., y González, G. M. (2015). Genotyping, extracellular compounds, and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated from Mexican patients. *Medical Mycology*, 53(5), 505–511. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv009>
- Nakajima, A., Saraya, T., Mori, T., Ikeda, R., Sugita, T., Watanabe, T., Fujiwara, M., Takizawa, H., y Goto, H. (2013). Familial summer-type hypersensitivity pneumonitis

- in Japan: two case reports and review of the literature. *BMC Research Notes*, 6(1), 371. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-371>
- Nobrega de Almeida, J., Moreno, L., Francisco, E. C., Noronha Marques, G., Mendes, A. V., Barberino, M. G., y Colombo, A. L. (2021). *Trichosporon asahii* superinfections in critically ill COVID-19 patients overexposed to antimicrobials and corticosteroids. *Mycoses*, 64(8), 817–822. <https://doi.org/10.1111/myc.13333>
- Nocua-Báez, L. C., Uribe-Jerez, P., Tarazona-Guaranga, L., Robles, R., y Cortés, J. A. (2020). Azoles de antes y ahora: una revisión. *Revista Chilena de Infectología*, 37(3), 219-230.
- Paphitou, N. I., Ostrosky-Zeichner, L., Paetznick, V. L., Rodriguez, J. R., Chen, E., y Rex, J. H. (2002). In Vitro Antifungal Susceptibilities of *Trichosporon* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(4), 1144–1146. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.1144-1146.2002>
- Parashar, A., Rastogi, V., Rudramurthy, S. M., Ghosh, A. K., Chander, J., y Kindo, A. J. (2022). Faster and accurate identification of clinically important *Trichosporon* using MALDI TOF MS. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 40(3), 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2022.05.014>
- Patel, R. (2019). A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. *Journal of Fungi*, 5(1), 4. <https://doi.org/10.3390/jof5010004>
- Pérez, C., Goitía, K., Mata, S., Hartung, C., Colella, M. T., Reyes, H., Hernández, C., Villarroel, M., Ontiveros, J., Magaldy, S., y Suárez, R. (2002). Utilización del caldo de urea de Stuart para el test de la ureasa, como prueba en el diagnóstico de las levaduras. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2), 136–140. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200008
- Pérez J, Guna R, Orta N, Gimeno C. (2021) Nuevos Azoles : Voriconazol. Control Calidad SEIMC. Recuperado el 8 de Julio de 2023, de <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/Neoazoles.pdf>

- Pfaller, M. A., Woosley, L. N., Messer, S. A., Jones, R. N., y Castanheira, M. (2012). Significance of Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Clinically Significant Yeasts and Moulds in a Global Antifungal Surveillance Programme. *Mycopathologia*, 174(4), 259–271. <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9551-x>
- Pierard G.E., Read, D., Pierard-Franchimont, C., Lothar, Y., Rurangirwa, A., y Estrada, J. A. (1992). Cutaneous manifestations in systemic trichosporonosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 17(2), 79–82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1992.tb00169.x>
- Pincus, D. H. (2006). Microbial Identification using the Biomérieux Vitek® 2 System. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, 1–32. https://store.pda.org/TableOfContents/ERMM_V2_Ch01.pdf
- Pincus, D. H., Orenge, S., y Chatellier, S. (2007). Yeast identification – past, present, and future methods. *Medical Mycology*, 45(2), 97–121. <https://doi.org/10.1080/13693780601059936>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., y Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rezusta López, A., Sánchez Sousa, A., y Gil Tomás, J. (2007). Capítulo 3: Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. En Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., Rubio-Calvo, MC. (Eds.), *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*. Bilbao, España. <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo13.pdf>
- Rizzitelli, G., Guanziroli, E., Moschin, A., Sangalli, R., y Veraldi, S. (2016). Onychomycosis caused by *Trichosporon mucoides*. *International Journal of Infectious Diseases*, 42, 61–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.11.011>
- Roselino, A. M., Seixas, A. B., Thomazini, J. A., y Maffei, C. M. L. (2008). An outbreak of scalp white piedra in a Brazilian children day care. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(5), 307–309. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000500011>

- Salas-Campos, I., y Gross-Martínez, N. T. (2012). Agentes etiológicos de onicomicosis diagnosticadas en el laboratorio de micología médica de la Universidad de Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 54(2), 114–118. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0001-60022012000200008#Correspondencia1
- Salas-Campos, I., Gross-Martínez, N. T., y Carrillo-Dover, P. (2007). Micosis superficiales diagnosticadas en el laboratorio de micología médica de la Universidad de Costa Rica. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 28(1–2), 29–35. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0253-29482007000100004
- Salas Campos, I., Gross Martínez, N., y Carrillo Dover, P. (2011). *Micología general y médica: instructivo para prácticas de laboratorio* (1ª ed.). Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Salazar, G., y Campbell, J. (2002). Trichosporonosis, an unusual fungal infection in neonates. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 21(2), 161–165. <https://doi.org/10.1097/00006454-200202000-00016>
- Samaddar, A., Diwakar, J., Krishnan, P., Veena Kumari, H., Kavya, M., Konar, S., Sharma, D. A., Nandeesh, B., Goyal, A., y Nagarathna, S. (2022). COVID-19-associated brain abscess caused by *Trichosporon dohaense*: A case report and review of literature. *Medical Mycology Case Reports*, 35, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2021.12.002>
- Segrelles-Calvo, G., Araújo, G. R. D. S., Llopis-Pastor, E., y Frasés, S. (2021). *Trichosporon asahii* as Cause of Nosocomial Pneumonia in Patient With COVID-19: A Triple Co-infection. *Archivos de Bronconeumología*, 57, 46–48. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2020.11.007>
- Sequeira-Oviedo, P. M., Lozada-Alvarado, S., Salas-Campos, I., y Jaikel-Viquez, D. (2017). Susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Fusarium solani* provenientes de onicomicosis. *Dermatología Revista Mexicana*, 61(3), 197–205.

- Shivaprakash, M. R., Singh, G., Gupta, P., Dhaliwal, M., Kanwar, A. J., y Chakrabarti, A. (2011). Extensive White Piedra of the Scalp Caused by *Trichosporon inkin*: A Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia*, 172(6), 481–486. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9454-2>
- Silvestre, A. M. Jr., Miranda, M. A. B. R., y Camargo, Z. P. de. (2010). *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a Brazilian population. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 628–634. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300013>
- Solano Venegas, F., Rivera Barquero, Á., y Alfaro Vargas, T. (2020). Fungemia por *Trichosporon asahii* secundaria a infección de piedra blanca en paciente indígena. *Revista Ciencia y Salud: Integrando Conocimientos*, 4(2), 14–19. <https://revistacienciaysalud.ac.cr/ojs/index.php/cienciaysalud/article/view/121/196>
- Sprute, R., Bethe, U., Chen, S. C.-A., y Cornely, O. A. (2022). EQUAL *Trichosporon* Score 2022: an ECMM score to measure QUALity of the clinical management of invasive *Trichosporon* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(6), 1779–1784. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac085>
- Sugita, T. (2011). *Trichosporon*. En Kurtzman C. P., Fell, J. W. y Boekhout T (Eds.), *The Yeasts* (pp. 2015–2061). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00161-0>
- Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T., y Shinoda, T. (2002). Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1826–1830. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1826-1830.2002>
- Sun, W., Su, J., Xu, S., y Yan, D. (2012). *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. *Journal of Medical Microbiology*, 61(12), 1750–1757. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.049817-0>
- Thompson, G. R., Wiederhold, N. P., Sutton, D. A., Fothergill, A., y Patterson, T. F. (2009). In vitro activity of isavuconazole against *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*,

- Saccharomyces* and *Pichia* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1), 79–83. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp138>
- Tsai, M. S., Yang, Y. L., Wang, A. H., Wang, L. S., Lu, D. C. T., Liou, C. H., Hsieh, L. Y., Wu, C. J., Cheng, M. F., Shi, Z. Y., y Lo, H. J. (2012). Susceptibilities to Amphotericin B, Fluconazole and Voriconazole of *Trichosporon* Clinical Isolates. *Mycopathologia*, 174(2), 121–130. <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9525-z>
- U.S. Food and Drug Administration. (2017). *Class 2 Device Recall Vitek 2 YST ID*. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado el 8 de Julio de 2023, de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfres/res.cfm?id=155042>
- Vashishtha, V. M., Mittal, A., y Garg, A. (2012). A fatal outbreak of *Trichosporon asahii* Sepsis in a neonatal intensive care unit. *Indian Pediatrics*, 49(9), 745–747. <https://doi.org/10.1007/s13312-012-0137-y>
- Villalobos-Castro, S., Jaikel-Viquez, D., Ortiz-Solano, D., Chaves-González, L. E., y Gross, N. T. (2020). Antifungal Activity of Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, Amphotericin B and Caspofungin against *Candida parapsilosis* Blood Isolates. *Acta Scientific Microbiology*, 3(9), 53–58. <https://actascientific.com/ASMI/pdf/ASMI-03-0677.pdf>
- Walshe, M. M., y English, M. P. (1966). Fungi in nails. *The British Journal of Dermatology*, 78(4), 198–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1966.tb12205.x>
- Watson, K. C., y Kallichurum, S. (1970). Brain Abscess Due To *Trichosporon cutaneum*. *Journal of Medical Microbiology*, 3(1), 191–193. <https://doi.org/10.1099/00222615-3-1-191>
- Wolf, D. G., Falk, R., Hacham, M., Theelen, B., Boekhout, T., Scorzetti, G., Shapiro, M., Block, C., Salkin, I. F., y Polacheck, I. (2001). Multidrug-Resistant *Trichosporon asahii* Infection of Nongranulocytopenic Patients in Three Intensive Care Units. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4420–4425. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4420-4425.2001>

- Youker, S. R., Andreozzi, R. J., Appelbaum, P. C., Credito, K., y Miller, J. J. (2003). White piedra: further evidence of a synergistic infection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(4), 746–749. [https://doi.org/10.1067/S0190-9622\(03\)00459-6](https://doi.org/10.1067/S0190-9622(03)00459-6)
- Zhang, D., Lu, X., Liao, Y., Xia, Z., Peng, Z., Yang, X., y Yang, R. (2019). Rapid and Simple Detection of *Trichosporon asahii* by Optimized Colony PCR. *BioMed Research International*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/1803278>
- Zhang, E., Sugita, T., Tsuboi, R., Yamazaki, T., y Makimura, K. (2011). The opportunistic yeast pathogen *Trichosporon asahii* colonizes the skin of healthy individuals: analysis of 380 healthy individuals by age and gender using a nested polymerase chain reaction assay. *Microbiology and Immunology*, 55(7), 483–488. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00341.x>

Anexos

Cuadro 4. Datos demográficos de los 17 aislamientos analizados en este estudio, obtenidos de micosis superficiales y sistémicas de pacientes en laboratorios clínicos de Costa Rica entre 1995 y 2021.

Año	Sitio Anatómico	Lugar	Sexo	Edad	Identificación propuesta
1995	Cabello (piedra blanca)	HCG	--	--	<i>T. asahii</i>
1996	Uñas de pies	HCG	--	--	<i>T. asahii</i>
1995	Cabello (piedra blanca)	HMX	--	--	<i>T. asahii</i>
2003	Biopsia de hígado	--	--	--	<i>T. asahii</i>
2003	--	HCG	--	--	<i>Cryptococcus neoformans</i>
2007	Cabello (piedra blanca)	HCG	--	--	<i>T. asahii</i>
2016	Aspirado endotraqueal	H Trauma	Masculino	53	<i>T. asahii</i>
2017	Uñas de pies	UCR	Masculino	66	<i>T. asahii</i>
2017	Uñas de pies	UCR	Femenino	60	<i>T. asahii</i>
2018	Uñas de pies	Cartago	--	--	<i>Candida famata</i>
2018	Uñas de pies	UCR	Masculino	38	<i>Candida ciferii</i>
2018	Uñas de pies	HCG	Masculino	32	<i>T. asahii</i>
2019	Uñas de pies	UCR	Femenino	66	<i>T. asahii</i>
2021	Uñas de manos	H Trauma	Masculino	34	<i>T. asahii</i>
2021	Orina	Guápiles	Masculino	47	<i>T. asahii</i>
--	Cabello (piedra blanca)	Puntarenas	Femenino	7	<i>Trichosporon</i>
--	Secreción peritoneal	HNN	Masculino	--	<i>T. mucoides</i>

HCG: Hospital Dr. Rafael Ángel Calderón Guardia, **HMX:** Hospital México, **UCR:** Universidad de Costa Rica, **H. Trauma:** Hospital del Trauma, **HNN:** Hospital Nacional de Niños. Se desconocen algunos datos demográficos, estos se indican con doble guión (--).