



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DEL NORDESTE



FACULTAD
DE MEDICINA

Maestría en Micología Médica

**Diversidad de especies de *Scedosporium* provenientes de
muestras clínicas de Argentina y su sensibilidad in vitro frente a
antifúngicos.**

Maestrando

Ruben A. Abrantes

Director

Nicolás Refojo

Año 2017

Indice	Pág.
Indice	1
Resumen	2
Introducción	4
Biología	4
Perspectiva histórica y taxonomía	6
Delimitación del género e inferencia filogenética	9
Ecología	12
Importancia clínica	13
Sensibilidad a las drogas antifúngicas	15
Distribución	17
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivo	21
Materiales y métodos	22
Cepas analizadas	22
Examen morfológico	22
Métodos moleculares	24
Análisis filogenético	26
Pruebas de sensibilidad in vitro	27
Resultados	28
Discusión	46
Conclusiones	52
Bibliografía	53
Anexo I	59
Anexo II	60

Resumen

Las especies del género *Scedosporium* Sacc. ex Castell. & Chalm. pertenecen al orden Microascales (clase Sordariomycetes, división Ascomycota). Estos hongos se encuentran presentes en el suelo, aguas residuales y aguas contaminadas, mayormente en áreas modificadas por el ser humano. Actualmente, se aceptan ocho especies dentro del género: *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. angustum*, *S. desertorum*, *S. minutisporum*, *S. dehoogii*, *S. aurantiacum* y *S. cereisporum*. *Scedosporium apiospermum*, *S. boydii* y *S. angustum* pertenecen al “Complejo de especies *S. apiospermum*”, siendo dificultosa su discriminación en base a sus características fenotípicas. Utilizando como marcadores moleculares la región ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) del ADNr y el gen de la β -tubulina (*BT2*) es posible la separación del “complejo de especies” del resto de las especies de *Scedosporium* y géneros filogenéticamente próximos como *Lomentospora prolificans* anteriormente *Scedosporium prolificans*.

Las cepas de *S. boydii* y *S. apiospermum* se han aislado de muestras clínicas en casi todo el mundo y ambas especies se consideran hongos oportunistas con espectros similares de manifestaciones clínicas. *Scedosporium aurantiacum* es principalmente recuperado del ambiente y de pacientes con FQ en Australia, aunque también está presente en Europa. No se han reportado casos de infecciones por *S. aurantiacum* en el continente americano.

El objetivo de este trabajo fue aportar al conocimiento de la diversidad de especies de *Scedosporium* de interés clínico en Argentina, mediante estudios fenotípicos, filogenéticos, y de sensibilidad antifúngica *in vitro*, de las cepas conservadas entre 1985 y 2017 y depositadas en la Colección de Cultivos del Departamento Micología (DMic) del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) “Dr. Carlos G. Malbrán”, Argentina. El análisis de las secuencias nucleotídicas combinadas de los marcadores ITS y *BT2* mostró que 40 de las 43 cepas estudiadas, pertenecen a las especies *S. boydii*, *S.*

apiospermum y *S. angustum*, todas ellas correspondientes al clado “complejo de especies *S. apiospermum*”. Los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM) que presentaron los aislados de este complejo son similares a los comunicados en previos reportes a nivel internacional. Presentando una distribución no uniforme de los valores de la CIM, por lo que es necesario la determinación in vitro de cada aislado.

Dos aislados del total han sido identificados como *S. aurantiacum*, especie no reportada con anterioridad en las Américas. Sorprendentemente, una de dichas cepas, DMic 175588 mostró una conidiogénesis tipo “*Polycytella*”, hasta el presente solo reportada para *S. apiospermum*. Además, una de estas cepas DMic 175378 fue el primer aislado clínico autóctono ya que el paciente jamás ha salido de su país de origen. Ambos aislados presentaron valores elevados de CIM para todos los antifúngicos ensayados.

Una de las cepas estudiadas, DMic 165285, resultó ser genéticamente idéntica a la cepa tipo *Indiella americana* (Delemare Gatti 1929), descrita hace 88 años a partir de un caso de micetoma en Sudamérica. Las dos cepas se separaron filogenéticamente del resto de las especies, formando un nuevo taxón, se propone para ambas una nueva especie, *Scedosporium clavisporum*.

El 65% (28/43) de las cepas estudiadas mostraron valores de CIM ≥ 2 mg/L para la anfotericina B (AB) y un 35% (15/43) los mismos valores de CIM para el itraconazol (IZ). El voriconazol (VZ) resultó ser el antifúngico más activo frente a los hongos estudiados, ya que el 100% de *S. angustum* (6/6), el 100% de *S. aurantiacum* (2/2), el 95 % de *S. boydii* (20/21) y el 83 % de *S. apiospermum* (10/12) presentaron una CIM ≤ 2 mg/L.

Este trabajo demuestra que mayoritariamente los aislados clínicos en Argentina pertenecen al “Complejo de especies *S. apiospermum*” y que *S. aurantiacum* está presente en nuestro continente; también se describe una especie nueva y se presentan los valores de CIM de todas las cepas estudiadas.

Introducción

Biología

Scedosporium Sacc. ex Castell. & Chalm. (1919) (1) Microascaceae, Microascales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Dycaria, Fungi. Como muchos otros ascomicetes su ciclo de vida consiste en desarrollar una fase sexual o teleomorfo, caracterizado por la producción de esporas sexuales (ascosporas), y una fase asexual o anamórfica en la que produce esporas asexuales (conidios) (Figura 1).

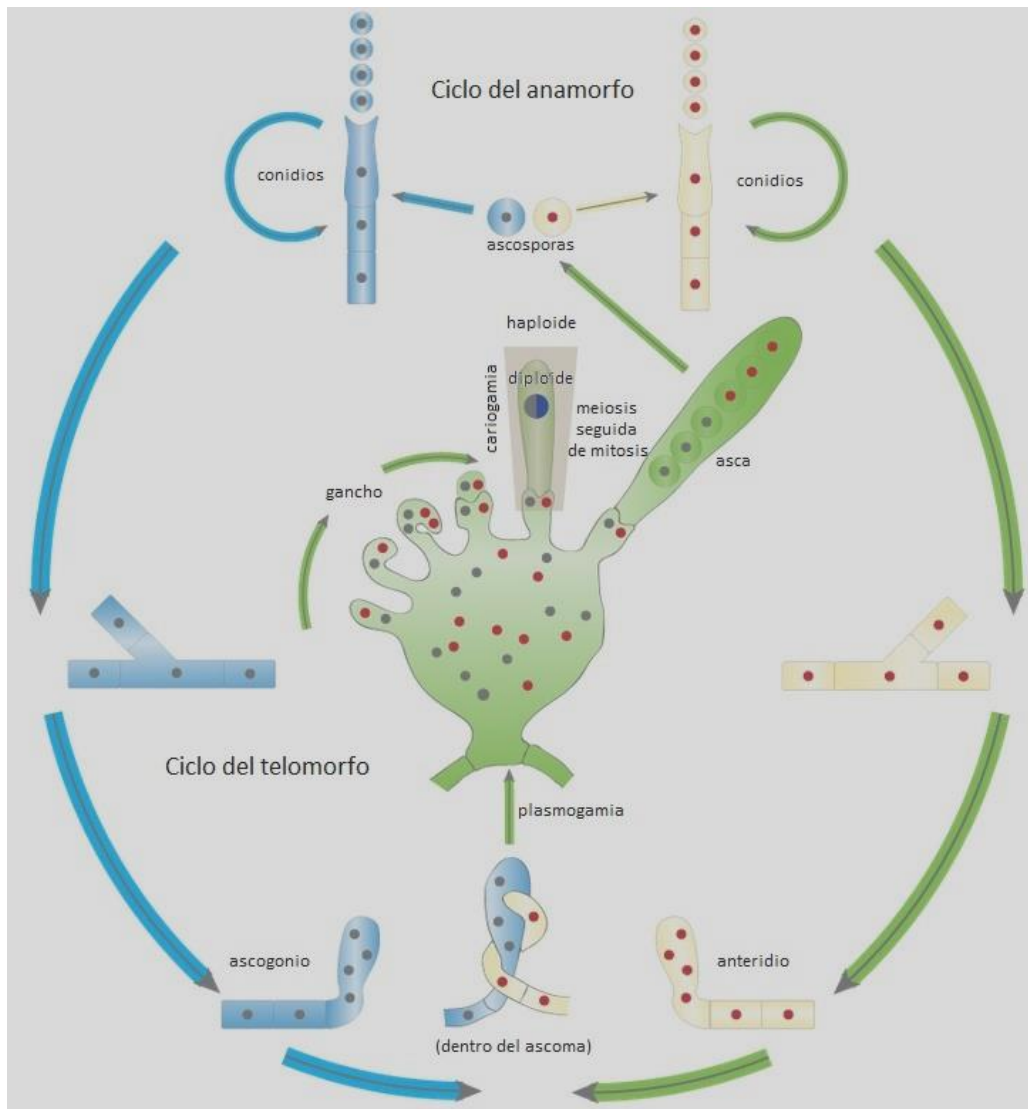


Figura 1. Ciclo de vida de Ascomicota. *Atlas of Clinical Fungi* Versión On line 4.1.4

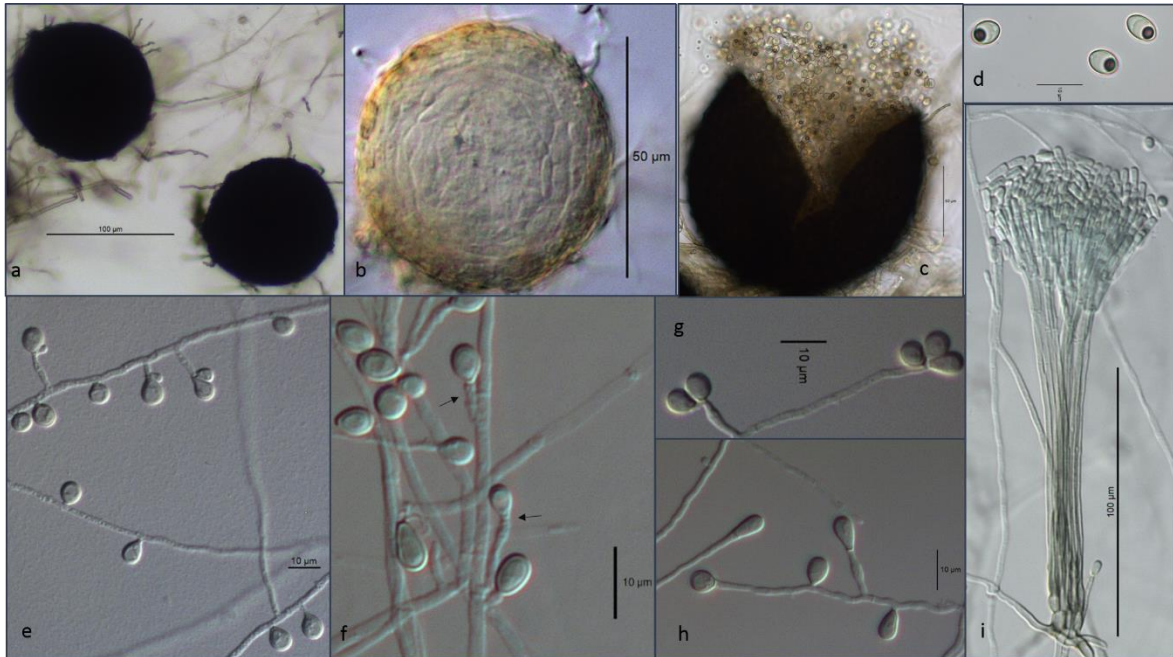


Figura 2. Morfología de *Scedosporium*. a- Cleistotecios, b- Textura epidermoidea en cleistotecio joven, c- Cleistotecio abierto con ascosporas, d- Ascosporas, e- Conidios sobre células conidiógenas diferenciadas y no diferenciadas (los conidios se producen directamente sobre las hifas, conidios sésiles o accesorios), f- Células conidiógenas anelídicas (indicadas con flechas), g- Conidios dispuestos en cabezas húmedas, h- Conidios solitarios, i- Sinema con células conidiógenas apicales y conidios claviformes a cilíndricos “*Graphium*”.

El género *Scedosporium* tiene la particularidad de presentar tres formas diferentes de caracteres morfológicos en cultivo, una forma sexual o teleomorfo y dos formas asexuales o anamorfos, denominados sinanamorfos, todas estas estructuras se muestran en la Figura 2 (2).

El teleomorfo, que era conocido como *Pseudallescheria* Negroni & I. Fischer (1944), se caracteriza por la producción de ascomas esféricos cerrados (cleistotecios) de paredes finas y textura epidermoidea. Los ascos producidos son esféricos, de paredes delgadas y evanescentes, que contienen generalmente ocho ascosporas elipsoidales o fusiformes (3–5).

Uno de los anamorfos que caracteriza al género *Scedosporium* Sacc. ex Castell. & Chalm. (1919) presenta conidióforos no ramificados, solitarios o agrupados en verticilos de dos a

tres células conidiógenas. Las células conidiógenas producen conidios de manera enteroblástica y desarrollo anelídico (6). Estas células conidiógenas o anélides también pueden desarrollarse directamente de hifas indiferenciadas. Los conidios son de forma ovoidal o elipsoidal de color marrón y se encuentran solitarios o dispuestos en cabezas húmedas (2).

El otro anamorfo, no siempre presente en los cultivos, presenta conidióforos organizados en sinemas, que son conjuntos de hifas agrupadas que se diferencian en la parte terminal en células conidiógenas también anelídicas, formando conidióforos agrupados y erectos. Estos producen conidios que forman una masa húmeda en el ápice de dicha estructura. Los conidios son menos pigmentados, más largos y claviformes que los del anamorfo *Scedosporium*. Esta forma se nombraba como estado *Graphium*, por la similitud con los sinemas que produce el género *Graphium* Corda (2), que es un género diferente a *Scedosporium* que se encuentra también en el orden Microascales, pero dentro de la familia Graphiaceae.

Perspectiva histórica y taxonomía

En la familia Microascaceae, se encuentra el género *Petriella* Curzi, cuyo teleomorfo es morfológicamente similar a *Pseudallescheria* y presenta anamorfos de la forma *Scedosporium* y *Graphium*. Sin embargo, presenta ascomas ostiolados (poseen una apertura por donde salen ascosporas) carácter que varía de acuerdo a características culturales (7). Estudios basados en el ADN ribosomal (ADNr) demostraron que *Petriella* y *Pseudallescheria* son filogenéticamente diferentes (8,9). *Microascus* Zokal es otro género que presenta ascomas similares a *Pseudallescheria*, pero éste tiene como anamorfo al género *Scopulariopsis* Bainer que se caracteriza por producir conidios secos en cadena (6).

Hasta el año 2011 la nomenclatura de hongos permitió el uso de múltiples nombres que describen las etapas asexuales y sexuales de un mismo hongo (Tabla 1 y 2), dado que era muy dificultoso establecer los ciclos de vida de un hongo (conexión entre el teleomorfo y anamorfo) sólo con características morfológicas. En ese año, se llegó a un acuerdo general entre los micólogos para abolir oficialmente el sistema dual de nomenclatura para hongos, como se establece en la «Declaración de Ámsterdam sobre la Nomenclatura Fúngica» y esbozada por Hawksworth en 2011(10).

Tabla 1. Cambios nomenclaturales para *Scedosporium apiospermum*

Nombres sinónomos	Año	Eventos de cambio
<i>Monosporium apiospermum</i> Saccardo	1911	<i>Monosporium apiospermum</i> Saccardo
<i>Scedosporium apiospermum</i> (Saccardo) Castellani & Chalmers	1919	1911 ≡ <i>Scedosporium apiospermum</i> (Saccardo) Castellani & Chalmers
<i>Aleurisma apiospermum</i> (Saccardo) Maire	1921	1919 ≡ <i>Aleurisma apiospermum</i> (Saccardo) Maire 1921.
<i>Sporocybe borzinii</i> Goidánich	1937	
<i>Acremonium suis</i> Bakai	1967	
<i>Polycytella hominis</i> Campbell	1987	
<i>Scedosporium</i> clade 4 Gilgado	2008	
<i>Pseudallescheria apiosperma</i> Gilgado	2010	

Tabla 2. Cambios nomenclaturales para el género *Pseudallescheria*

Nombre	Año	Especies involucradas en los eventos de cambio
<i>Allescheria boydii</i> Shear	1922	
<i>Pseudallescheria shearii</i> Negróni & I. Fisch.	1944	
<i>Petriellidium</i> Malloch	1970	<i>Petriellidium boydii</i> (Shear) Malloch. <i>Petriellidium africanum</i> Arx & G. Franz <i>Petriellidium angustum</i> Malloch & Cain <i>Petriellidium ellipsoideum</i> Arx & Fassat <i>Petriellidium fimeñi</i> Arx, Mukerji & N. Singh <i>Petriellidium fusoidium</i> Arx <i>Petriellidium desertorum</i> Arx & Moustafa
<i>Pseudallescheria boydii</i> (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello	1982	<i>Petriellidium boydii</i> (Shear) Malloch (1922) = <i>Pseudallescheria shearii</i> Negróni & I. Fisch (1944) <i>Pseudallescheria boydii</i> (especie tipo) <i>Pseudallescheria africana</i> (Arx & G. Franz) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello <i>Pseudallescheria angusta</i> (Malloch & Cain) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello <i>Pseudallescheria desertorum</i> (Arx & Moustafa) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello <i>Pseudallescheria ellipsoidea</i> (Arx & Fassat.) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello <i>Pseudallescheria fimeti</i> (Arx, Mukerji & N. Singh) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello <i>Pseudallescheria fusioidea</i> (Arx) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello.

Los nombres genéricos principales que se han aplicado al género dimorfo *Scedosporium/Pseudallescheria* fueron los siguientes: *Allescheria* Sacc. & P. Syd. 1899, *Allescheria* R. Hartig 1899, *Monosporium*, *Pseudallescheria*, *Scedosporium* y *Petriellidium*. Basándose en la identidad de las especies tipo de cada género, los primeros tres fueron excluidos, ya que éstos son inválidos o representan hongos totalmente diferentes (11).

Lackner y col. en el año 2014, proponen que *Scedosporium* es el nombre genérico válido más antiguo, publicado en 1919 (Castellani y Chalmers 1919) con la especie tipo *Scedosporium apiospermum*. Y por razones de prioridad, el nombre genérico *Pseudallescheria* Negroni & I. Fischer (1944) debe ser tratado como sinónimo de *Scedosporium* (11). Bajo este nuevo enfoque, se analizan las relaciones filogenéticas de Microascaceae, en donde quedan definidos cuatro grupos, uno de ellos, integrado por *Scedosporium* y por otros miembros que producen conidios húmedos o mucosos. Todos ellos exhiben estados polimórficos: el anamorfo *Scedosporium*, el anamorfo sinematoso *Graphium* y el teleomorfo *Pseudallescheria*. En la tabla 3 (Lackner y col.) se muestra la presencia o ausencia de estos estados, donde se aplica el nombre *Scedosporium* como prioritario. Los géneros correctamente nombrados de este grupo son *Lomentospora*, *Lophotrichus*, *Parascedosporium*, *Petriella*, *Petriellopsis* y *Scedosporium* (11).

Tabla 3. Polimorfismo en *Scedosporium* y géneros relacionados (11).

Nombre genérico	Epiteto	Nombres sinónimos comúnmente usados	Sinanamorfo/Teleomorfo +/-
<i>Lomentospora</i>	<i>prolificans</i>	<i>Scedosporium prolificans</i> , <i>Scedosporium inflatum</i>	"scedosporium"/-
<i>Lophotrichus</i>	<i>fimeti</i>	<i>Petriellidium fimeti</i> , <i>Pseudallescheria fimeti</i>	<i>Scedosporium</i> , ' <i>Graphium</i> '/+
	<i>macrosporas</i>	-	<i>Scedosporium</i> /+
	<i>apiospermum aurantiacum</i>	<i>Pseudallescheria apiosperma</i> -	<i>Scedosporium</i> , ' <i>Graphium</i> '/+ <i>Scedosporium</i> /-
<i>Scedosporium</i>	<i>boydii</i>	<i>Allescheria boydii</i> , <i>Petriellidium boydii</i> , <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Polycytella hominis</i>	<i>Scedosporium</i> , ' <i>Graphium</i> '/+
	<i>dehoogii</i>	-	<i>Scedosporium</i>
	<i>minutisporum desertorum</i>	<i>Pseudallescheria minutispora</i> <i>Pseudallescheria desertorum</i>	<i>Scedosporium</i> /+ artroconidios
<i>Parascedosporium</i>	<i>putredinis</i>	<i>Graphium putredinis</i> , <i>Rhinocladium lesnei</i> , <i>Graphium lesnei</i> , <i>Graphium tectonae</i> .	' <i>Graphium</i> '
<i>Petriellopsis</i>	<i>africana</i>	<i>Petriellidium africanum</i> , <i>Pseudallescheria africana</i>	<i>Scedosporium</i>
	<i>gutulata</i>	<i>Microascus guttulatus</i>	<i>Scedosporium</i> , ' <i>Graphium</i>
<i>Petriella</i>	<i>setifera</i>	<i>Lophotrichus setifera</i> , <i>Microascus setifera</i>	<i>Scedosporium</i> , ' <i>Graphium</i>
	<i>sordida</i>	<i>Petriella asymmetrica</i> , <i>Melanospora asymmetrica</i>	<i>Scedosporium</i> , ' <i>Graphium</i>
	<i>musispora</i>		"scopulariopsis"

Delimitación del género e inferencia filogenética

Desde el año 1991, el género *Scedosporium* estuvo conformado por dos especies de importancia clínica: *Scedosporium prolificans* y *S. apiospermum* (considerado como anamorfo de *Pseudallescheria boydii*). En el año 2005 Gilgado y col. presentaron 2 nuevas especies, *S. aurantiacum* de origen clínico y *P. minutispora* de origen ambiental; en ese mismo trabajo se estudiaron todas las especies descritas de *Pseudallescheria* (12). En el año 2008, el mismo autor separa *S. apiospermum* de *P. boydii* considerándolas especies diferentes y propone *S. dehoogii* como una nueva especie (13) posteriormente, en el año 2010, comprueban que *S. apiospermum* es una especie heterotálica (14). La especie más recientemente descrita es *S. cereisporum* que fue aislada de sedimento de aguas residuales en Francia en 2016 (15).

En el año 2015, Chen y cols. definieron a *S. apiospermum*, *S. boydii* y *S. angustum* como “*S. apiospermum* species complex”, dado que las diferencias observadas entre los linajes no eran lo suficientemente consistentes y tampoco se encontraban diferencias clínicas entre las especies del complejo (16). La utilización de marcadores moleculares permitió detectar una distancia filogenética menor entre *S. desertorum*, *S. minutisporum*, *S. dehoogii*, *S. aurantiacum* y *S. cereisporum* en relación a *S. prolificans*, que se encuentra como una entidad separada a nivel genérico, por lo que fue separada del género y renombrada como *Lomentospora prolificans* (11).

En la actualidad se reconocen bajo inferencia filogenética 8 especies dentro del género *Scedosporium*: *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. angustum*, *S. minutisporum*, *S. desertorum*, *S. dehoogii*, *S. aurantiacum* y *S. cereisporum* (12,13,15,16).

En el año 2000, Rainer y cols., en base a la variación en las secuencias de genes ribosomales, afirmaron que *Pseudallescheria angusta*, *P. ellipsoidea* y *P. fusioidea* (descriptas en base a el tamaño del cleistotecio y de las acosporas) probablemente eran sinónimos de *P. boydii*, (17). Sin embargo, en 2005, Gilgado y cols. concluyen que son genética y morfológicamente diferentes de *P. boydii* (12). Aún hoy parece no estar resuelto el dilema y en los trabajos más recientes proponen que estas diferencias parecen estar dentro de la variación específica (18). Todas ellas pertenecen al “Complejo de especies *S. apiospermum*”, algunos autores, actualmente utilizan transitoriamente el nombre teleomórfico “*Pseudallescheria*” para nombrarlas, dado que aún está en conflicto su delimitación. En este trabajo de tesis, se utilizará para todas las especies tratadas el nombre genérico *Scedosporium*, aunque *Scedosporium angustum*, *S. ellipsoideum* y *S. fusioideum* no son válidos. Pensamos que nomenclaturalmente no es correcto que dentro del “complejo de especies *Scedosporium apiospermum*” haya especies nombradas como “*Pseudallescheria*”.

En el año 2008, Gilgado y cols.(13) incluyeron dentro del análisis otra especie ubicada filogenéticamente más distante, que también presenta un anamorfo *Scedosporium* y figura allí como "*Indiella americana*". Esta especie se encuentra representada únicamente por la cepa CBS 218.35 y las características estudiadas no fueron suficientes para su correcta delimitación. El género "*Indiella*" Brumpt fue introducido por el autor, para agentes etiológicos estériles de micetoma de grano blanco y *Madurella* para los de micetoma de grano negro. Incluía como especie a "*Indiella somaliensis*" (= *Streptomyces somaliensis*) (19). Brumpt hizo hincapié en que el micetoma era un síndrome clínico y que varios hongos eran por lo tanto capaces de provocar la misma respuesta clínica (20). Un total de 21 especies han sido descritas en los géneros *Madurella* e "*Indiella*", 15 de ellas se las consideró especies de dudosa identidad y no se conservaba el material auténtico, el género "*Indiella*" fue descartado, "*Indiella americana*" Delamare y Gatti, cepa CBS 218.35 y "*Madurella clapierei*" (Catanei) Redaelli et Cif. fueron tomados como sinónimos de *P. boydii* en base a la observación de los cultivos disponibles (2,21).

Para inferir las relaciones filogenéticas entre los miembros de *Scedosporium/Pseudallescheria* se utilizaron diversos loci genéticos como marcadores moleculares, como las secuencias parciales de los genes de β -tubulina (*TUB* y *BT2*), del ADNr ITS (ITS1-5.8S-ITS2), de actina (*ACT*), del factor de elongación 1 α (*TEF1*) y de la proteína ribosomal pequeña 60S L10 (*L1*) (*RP60S*) (12,16). El uso de la región ADNr alcanza para separar el "Complejo *Scedosporium apiospermum*" (*S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. angustum*, *S. ellipsoideum* y *S. fusoideum*) de las especies *S. desertorum*, *S. minutisporum*, *S. dehoogii*, *S. aurantiacum* y *S. cereisporum*. Pero la mayor resolución se logra con *BT2*, que logra una mejor separación de todas las entidades y la distinción de subgrupos dentro del complejo (16,22,23).

Ecología

Diversos trabajos revelan que el género *Scedosporium* se obtiene de suelo y de aguas de áreas urbanas y agrícolas con contaminación orgánica, sobre todo con hidrocarburos de residuos humanos, animales e industriales presentes en medio ambiente (24,25). *Scedosporium* spp. muestra varios factores que probablemente puedan asociarse a estos hábitats, su capacidad para tolerar el 5% de NaCl, sobrevivir a muy baja presión parcial de oxígeno, utilizar el gas natural y/o compuestos aromáticos como fuentes de carbono (25–29). Kaltseis y cols., demostraron que existe una correlación positiva entre las altas concentraciones de amonio y la presencia de *Scedosporium* spp. en el suelo de las zonas industriales, parques y patios de recreo (25). Al parecer, el suelo con altos niveles de nitrógeno favorece el crecimiento de estas especies (30). Además, encontraron que la mayor cantidad especies obtenidas del género, se encontraron en suelos con un rango de pH de 6,1 - 7,5 (25). Estudios realizados en Australia por Harun y cols., mostraron que estos hongos se asociaron a localizaciones con alta actividad humana. Las cepas de *S. aurantiacum* fueron las más frecuentemente aisladas, seguidas por *L. prolificans* y en menor proporción *S. boydii*. Estos hallazgos coincidieron con la prevalencia relativamente alta de infecciones por *Scedosporium* en Australia y su presencia como colonizadores en pacientes con fibrosis quística (FQ) (30). En Francia, Rougeron y cols., también coinciden en que la mayor proporción de *Scedosporium* spp. se encuentra en aéreas modificadas por el ser humano, áreas agrícolas, fluidos de plantas de tratamiento de aguas residuales, parques infantiles y áreas industriales. En cambio no se detectaron a partir de muestras de suelos de bosques. Los suelos en los que fueron recuperados estos hongos, estaban en un rango de pH entre 6 y 8, lo que coincide con los estudios de Kaltseis y cols. (31). *S. dehoogii*, la especie más abundante, se detectó en todos los tipos de áreas modificadas por el ser humano, excepto en viñedos, mientras que *S. aurantiacum* se encontró

principalmente en áreas agrícolas. *S. boydii* y *S. apiospermum* se aislaron predominantemente de playas y patios de recreos. *S. minutisporum* se encontró sólo una vez en un parque infantil. Estos estudios presentan aislados desde fuentes potenciales de contaminación para pacientes con FQ (31). Aun así, su presencia en el medio ambiente no puede explicar su incidencia en estos pacientes, por lo que se necesita un mejor conocimiento de los mecanismos de virulencia para elucidar las diferencias en sus frecuencias en el contexto de esta enfermedad (31).

Importancia clínica

El género *Scedosporium* coloniza transitoriamente el tracto respiratorio en el hombre, en vías respiratorias anormales, como ocurre en los pacientes de FQ, también provoca reacciones broncopulmonares alérgicas, produce infección invasora local e infección diseminada por vía hematogena en pacientes inmunocomprometidos. En pacientes inmunocompetentes, la infección se presenta en SNC, después de sucesos de ahogamiento (Near-drowning). Además la infección por *Scedosporium* comprende un amplio espectro de entidades clínicas, es uno de los principales agentes de micetoma en Argentina y en el mundo (32,33), produce artritis, osteomielitis, queratitis, infección linfocutánea, sinusitis, otitis, entre otras (20,24).

La infección o colonización se adquiere por inhalación o inoculación traumática, generalmente recibe el nombre de scedosporiosis, dado que al aislado presenta el anamorfo *Scedosporium*, pero esta entidad también incluye infecciones causadas por otro género, *Lomentospora prolificans* (*Scedosporium prolificans*). Este último, es un agente patógeno oportunista causante de infecciones graves y de difícil tratamiento, debido a la resistencia intrínseca a las drogas antifúngicas disponibles. Ambos géneros tienen muy baja frecuencia de recuperación en el aire y alta presencia en pulmones de pacientes con

FQ; en esos casos la colonización de vías aéreas dañadas puede persistir y posteriormente resultar en enfermedad invasora (30,34,35).

Resumen de las manifestaciones clínicas de acuerdo con el síndrome clínico (20,24):

- *Enfermedad localizada*: micetoma de grano blanco, artritis, osteomielitis, queratitis y endoftalmitis, onicomicosis, infecciones linfocutáneas.
- *Colonización*: sinusitis, otitis, colonización pulmonar en fibrosis quística, bola fúngica pulmonar, alergia broncopulmonar. (La colonización puede estar seguida de hipersensibilización inducida por los antígenos de las hifas que desarrollan en los tejidos).
- *Enfermedad sistémica invasora*: infección invasora pulmonar, endocarditis, infección diseminada, infecciones en pacientes con SIDA, infecciones en el SNC posterior a episodio de ahogamiento (Near-drowning).

La scedosporiosis es clínicamente indistinguible de otras infecciones invasoras de hongos miceliales y el diagnóstico se basa en la recuperación o detección del agente etiológico en las muestras clínicas. Las imágenes histopatológicas de las lesiones son similares a las del género *Aspergillus* y otros hifomicetes (20,24). Existen medios semiselectivos que mejoran la recuperación del grupo *Scedosporium/Lomentospora* en muestras clínicas no estériles, como el tracto respiratorio y de diversas muestras ambientales (30,31,36–38). Para complementar los métodos basados en cultivos se emplean métodos moleculares para detectar directamente el ADN del hongo en los tejidos, pero aún merecen una evaluación profunda para uso diagnóstico de rutina (39). Las técnicas de secuenciación de ADN, *Rolling Circle Amplification* (RCA) y *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) pueden utilizarse para la identificación de especies desde cultivos, aunque deben ser estudiados en forma comparativa para

valorar su utilidad en el diagnóstico (40,41). Tales métodos permitieron mostrar la alta prevalencia de *Scedosporium* en pacientes con FQ en Australia (30,35).

Las especies de *Scedosporium* obtenidas de aislados clínicos son *S. apiospermum*, *S. boydii* (junto con las otras especies que se encuentran dentro del “complejo *S. apiospermum*” como unidades taxonómicas no bien definidas, *S. angustum*, *S. ellipsoideum* o *S. fusoideum*) y *S. aurantiacum*. En este sentido, suele incluirse en los análisis a *Lomentospora prolificans* sabiendo que es otro género, para mantener el enfoque tradicional y observar las diferencias entre éste y *Scedosporium*. La prevalencia de las diferentes especies permanece incierta, debido a que los aislados se interpretan en los laboratorios hospitalarios como *Scedosporium* sp. en un sentido amplio, pero difícilmente se los identifica a nivel de especie. La identificación es importante debido a que existen diferencias específicas entre ellas en relación a la epidemiología y la susceptibilidad a las drogas antifúngicas.

Sensibilidad a las drogas antifúngicas *in vitro*

El tratamiento antifúngico es problemático, dado que *Scedosporium* se caracteriza por presentar *in vitro*, valores elevados de CIM (concentración inhibitoria mínima) a la mayoría de antifúngicos sistémicos, como anfotericina B (AB), itraconazol (IZ) y concentración efectiva mínima (CEM) para las equinocandinas (EC). En pacientes inmunocompetentes predomina la infección localizada, pero en más de la mitad de pacientes inmunosuprimidos las infecciones son diseminadas y la tasa de mortalidad alcanza hasta un 75% y se ve aumentada aún más en pacientes con compromiso de SNC (>90%) (42).

Luego del reordenamiento a través de la filogenia molecular y la nueva constitución de especies en *Scedosporium*, el estudio de los patrones de sensibilidad a las drogas

antifúngicas se enfocó en determinar si los mismos eran específicos de cada especie y si la identificación de las mismas era relevante para la elección del tratamiento (18).

El comportamiento más distante es el de *L. prolificans*, que presenta patrones de resistencia a todos los antifúngicos sistémicamente activos, incluyendo las nuevas EC y los azoles (43,44). Dentro del género, *S. aurantiacum* muestra alta resistencia *in vitro* a AB e IZ y a todos los demás fármacos antimicóticos probados, por lo que se considera al Voriconazol (VZ) como el único compuesto antifúngico con actividad *in vitro* contra esta especie. Por lo tanto, la diferenciación de las cepas de *S. aurantiacum* de otras especies de *Scedosporium* es de importancia para la elección de la terapia antifúngica (18). *S. dehoogii* es considerada ambiental por la ausencia de reportes clínicos, aunque esto puede deberse a que no puede ser diferenciada morfológicamente de otras especies de *Scedosporium*. El estudio realizado sobre algunos aislados de esta especie, demostró que presenta valores de CIM altas para VZ, con valores que lo ubican después de *S. prolificans* (18). En estudios de la infección en modelo murino, *S. dehoogii* y *S. aurantiacum* resultaron ser las especies más virulentas del género (45). El perfil de *S. minutisporum* muestra una tendencia similar a la de *S. apiospermum* y *S. boydii*, pero faltan analizar más cepas para poder hacer una generalización confiable (18,46).

Las cepas de *S. boydii* y *S. apiospermum* se han aislado de muestras clínicas en todo el mundo y ambas especies se consideran hongos oportunistas ambientales con espectros similares de manifestaciones clínicas. Son las especies más prevalentes del género *Scedosporium*. Para estos integrantes del “complejo de especies *S. apiospermum*” la relación CIM / CEM para todas las drogas antifúngicas, no muestran una distribución normal, excepto para el VZ (18). Por lo que es necesario estudiar cada aislado clínico en forma individual para establecer un tratamiento dirigido. En 2014, Lackner y cols. analizaron la diversidad inter e intraespecífica del género con el objetivo de establecer

una distribución de resistencia entre especies y cepas (46). Las especies clínicamente más relevantes, *S. boydii* y *S. apiospermum*, presentaron resistencia antifúngica similar, las diferencias se observaron en cepas individuales de estas especies. El VZ se recomienda como tratamiento de primera línea, dado que en general estas especies no manifiestan resistencia frente a esta droga (18).

Distribución

Las especies del complejo de especies *S. apiospermum* están ampliamente distribuidas en todo el mundo, con numerosos reportes clínicos y ambientales (18,20,24). En nuestro país, los datos de casos de scedosporiosis son escasos y fragmentados, sin estudios multicéntricos específicos a nivel nacional. Las encuestas de micosis diagnosticadas realizadas por la Red Nacional de Laboratorios de Micología desde el año 2002, incluyen el reporte de las “hialohifomicosis” como un todo, por lo que no son informativas de las scedosporiosis en Argentina. Por otra parte, el estudio realizado por REMIIN entre 2010 y 2013 sobre infecciones fúngicas invasoras en 90 pacientes inmunocompetidos no HIV, no reportó ningún caso de enfermedad fúngica invasora (EFI) por *Scedosporium* spp.

Lomentospora prolificans se distribuye principalmente en el norte de España y en otros países de Europa, como Alemania, Francia y Bélgica (25,31,37,47–49). En Australia es particularmente abundante en suelo y es el segundo más frecuentemente aislado, luego de *S. aurantiacum* (30,35). En Asia se ha reportado un caso de endocarditis en Japón (50). En América del Norte, la mayoría de los casos documentados corresponden a Estados Unidos, principalmente en el sur del país (20). En Sudamérica hay pocos reportes publicados, uno en Brasil, uno en Argentina y otro en Chile. En los tres casos la identificación ha sido morfológica, solo que en el último país mencionado, la identificación ha sido confirmada por un centro de referencia (51–53). Nuestro laboratorio, como centro de referencia nunca ha recibido ningún aislado de *L. prolificans* de Argentina, y

lamentablemente no se ha conservado el aislado clínico del caso publicado, para confirmar su identificación. Esto sugiere que *L. prolificans* no está presente en nuestro país o, al menos, no es epidemiológicamente relevante.

S. aurantiacum aún no ha sido aislada de nuestras clínicas ni en muestras ambientales en el continente americano, está asociada a colonización de vías respiratorias en Europa y Australia, siendo más relevante en este último país, en donde se han reportado más casos de infecciones por esta especie (34,54,55). También ha sido aislado en Japón, de un paciente con absceso cerebral que sufrió casi ahogamiento durante el tsunami ocurrido en el año 2011 (56).

Justificación

Scedosporium es uno de los más importantes agentes de eumicetoma de grano blanco en Argentina y en el mundo. Emergió como patógeno, principalmente como causante de infecciones diseminadas en pacientes neutropénicos. Hasta hace pocos años se conocían únicamente dos especies de *Scedosporium*, *S. apiospermum* y *Lomentospora prolificans* (*Scedosporium prolificans*) esta última es más virulenta que todas las especies, ocasionando infecciones diseminadas con una elevada mortalidad y prácticamente resistentes a todos los antifúngicos disponibles. Dentro del “Complejo de especies *S. apiospermum*” la respuesta a los antifúngicos varía a nivel intraespecífico. Pero importantes diferencias se observaron en *S. aurantiacum*, la especie con menor sensibilidad. Considerando la alta mortalidad y los costos de tratamiento, es necesario diseñar estrategias de control y prevención. Sin un diagnóstico preciso, los médicos suelen recurrir a la terapia antifúngica empírica, exponiendo a los pacientes a tratamientos ineficientes, innecesarios y/o de alta toxicidad.

La diferenciación de estas especies, que causan un espectro amplio de infecciones y cuya identificación morfológica es dificultosa, solo es posible mediante el reconocimiento de las especies filogenéticas basadas en concordancia genealógica de secuencia (GCPSR). La utilización de *multilocus sequence typing* como herramienta, nos permitirá identificar con precisión las especies de este género, conocer la epidemiología local, determinar las especies circulantes en nuestro país y estudiar el comportamiento *in vitro* ante diferentes antifúngicos.

Hipótesis: La diversidad de especies del género *Scedosporium*, provenientes de muestras clínicas en nuestro país, es más amplia que la reportada.

Objetivo general:

Conocer las especies de *Scedosporium* circulantes en Argentina como agentes de scedosporiosis y los patrones de sensibilidad a los antifúngicos de uso clínico.

Objetivos específicos:

- a. Caracterizar cepas de *Scedosporium* de origen clínico conservadas en la colección DMic mediante la metodología de referencia polifásica.
- b. Conocer los patrones de sensibilidad intra e interespecie a los antifúngicos.

Materiales y métodos

Cepas analizadas. Se analizaron 43 aislados clínicos derivados entre los años 1985 y 2017, desde distintos hospitales del país al Centro Nacional de Referencia de Micología Clínica, Departamento Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (I.N.E.I) “Carlos G. Malbrán” – Administración Nacional de laboratorios e Institutos de Salud (A.N.L.I.S).

Fueron depositados en la Colección de Cultivos del Departamento Micología (DMic) como se detalla en la Tabla 4. Todos los aislados fueron conservados en vapor de nitrógeno líquido en crioviales con solución acuosa de glicerol al 10%.

Examen morfológico. Los aislados clínicos incluidos en este estudio fueron sometidos a un estudio de macro y micromorfología. Los hongos fueron subcultivados sobre agar papa glucosado (PDA) (75 g de papa, 20 g de glucosa, 15 g de agar en H₂O c.s.p. 1 l) y agar avena (OA) (30 g de avena arrollada, 1 g de MgSO₄ · 7 H₂O, 1,5 g de KH₂PO₄, 15 g de agar en H₂O c.s.p. 1 l). Para estudiar caracteres microscópicos y macroscópicos, se estudiaron las tasas crecimiento a 25, 37, 40 y 45°C en oscuridad.

Además, se evaluaron temperaturas de crecimiento a 38, 39, 42 y 43°C para los aislados en que se consideró necesario completar dicha información. Los caracteres macroscópicos de las colonias se observaron a los 7 y 14 días en ambos medios.

Las características microscópicas se determinaron haciendo montajes húmedos con ácido láctico al 65%, que luego se examinaron bajo microscopio óptico Leica DMF2500 (Leica Microsystems, Concord, Ontario). Las medidas de las estructuras y las microfotografías se obtuvieron con cámara fotográfica acoplada Leica DMC 2900 mediante el *Software* LAS 4.8 (Leica Microsystems, Concord, Ontario).

Tabla 4. Aislados clínicos derivados de distintos hospitales del país, conservados en la Colección de Cultivos DMic del Departamento Micología, INEI "Carlos G. Malbrán"- ANLIS.

Aislado	Nº de cultivo	Clado	Fuente	Año
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 85073	A	-	1985
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 90394	A	-	1990
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 993530	A	Pulmón	1999
<i>Scedosporium angustum</i>	DMic 01651	A	-	2001
<i>Scedosporium angustum</i>	DMic 031321	A	-	2003
<i>Scedosporium angustum</i>	DMic 031333	A	Cerebro	2003
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 062875	A	Pulmón	2006
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 073201	A	Espujo	2007
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 083385	A	Espujo	2008
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 083389	A	Pulmón	2008
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 083404	A	Córnea	2008
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 093482	A	Pulmón	2009
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 093510	A	Córnea	2009
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 103731	A	Córnea	2010
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 103737	A	Córnea	2010
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 103813	A	Córnea	2010
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 103859	A	Espujo	2010
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 114031	A	Córnea	2011
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 114032	A	BAL	2011
<i>Scedosporium angustum</i>	DMic 114102	A	Pie	2011
<i>Scedosporium ellipsoideum</i>	DMic 134375	A	Espujo	2013
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 134638	A	Espujo	2013
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 165033	A	BAL	2015
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165035	A	Biopsia de brazo	2015
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165036	A	Córnea	2015
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 165274	A	Herida de pierna	2013
<i>Scedosporium angustum</i>	DMic 165275	A	Córnea	2014
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 165279	A	Aspirado traqueal	2014
<i>Scedosporium clavisporum</i> sp. nov. ^a	DMic 165285	C	Lesión de mano	2016
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165286	A	Piel de mano	2015
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165287	A	Periprótéis columna	2016
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165288	A	BAL	2016
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165290	A	BAL	2016
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165291	A	Cerebro	2016
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 165341	A	Espujo	2016
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	DMic 175378	B	Espujo	2016
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 175421	A	<i>Chelonia mydas</i> ^b	2016
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 175525	A	Espujo	2017
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 175526	A	Espujo	2017
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 175583	A	Espujo seriado	2017
<i>Scedosporium angustum</i>	DMic 175584	A	Espujo seriado	2017
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 175585	A	Cerebro	2017
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	DMic 175588	B	Espujo	2017

^a Secuencias ITS y BT2 en Anexo II, ^b Tortuga marina.

Métodos moleculares. Para la extracción de ADN, a partir de cultivos incubados 7 días a 25 °C en PDA, se prepararon suspensiones de conidios (10^6 - 10^8 conidios/ml). Se sembraron 50 µl de esas suspensiones en placas de Petri de 6 cm de diámetro con caldo MEY (1% de extracto de malta, 0,4% de extracto de levadura, 0,4% de dextrosa, 4 ml / placa) y se incubaron a 25 °C entre 72 y 96 h. El micelio se recogió con una punta de pipeta, se secó completamente en papel estéril Whatman No. 2, y se transfirió a un tubo cónico de 50 ml, en el que se añadieron perlas de vidrio de 4 mm. El micelio se trituró colocándolo en nitrógeno líquido durante un minuto y agitándolo en vortex a velocidad máxima durante 30 segundos, alternando estos dos pasos hasta la pulverización completa y homogénea del micelio seco. El polvo resultante se resuspendió en 800 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 200 mM, NaCl 500 mM, EDTA 10 mM, SDS al 1%) y 800 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25: 24: 1), se homogeneizó y, luego de repetir el último paso, se agregaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó 15 min a 14000 rpm, se le agregaron 300 µl de isopropanol al sobrenadante, se centrifugó 10 min a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió en 100 µl de agua desmineralizada estéril. Se agregaron 30 µl de RNasa 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), se incubó 1 h a 37 °C, se agregaron 30 µl de Proteinasa K (0.2 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), se incubó 1 h a 55 °C y se repitió la extracción fenólica. Al sobrenadante se le agregaron 21 µl de NaCl 5M y 800 µl de etanol absoluto, se incubó 20 min a -20°C y se centrifugó 10 min a 14000 rpm. Se secó el pellet a 65 °C, se resuspendió en 100 µl de agua desmineralizada estéril y se conservó a -20°C hasta su uso.

Secuenciación. Se amplificaron mediante PCR las regiones parciales de los genes Beta Tubulina (*BT2*) e ITS del ADN ribosomal (ITS) (ITS1 - 5,8S - ITS2), en reacciones de 50 µl. La amplificación de la región ITS se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción con MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 250 mM, TRIS-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, 2,5 U Taq ADN

polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, CA), 0,2 μ M de los primer ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y 10 ng de ADN molde. La amplificación del gen *BT2* se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción con $MgCl_2$ 2 mM, dNTPs 250 μ M, ADN polimerasa Taq de 2,5 U (Invitrogen, Life Technologies, CA), 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, 0,2 μ M de los primer Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') y 10 ng de ADN molde.

La amplificación se llevó a cabo utilizando el Termociclador Applied Biosystems Veriti™, bajo las siguientes condiciones: una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, *annealing* a 55 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min, y una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min. En cada ensayo de PCR se incluyeron controles positivos y negativos. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, TAE 1X, durante 60 min a 100 V y se visualizaron por tinción con solución NaCl 0,1 M con GelRed™ 1x (Biotium, Hayward, CA), bajo luz UV en un transiluminador Gel Logic 212 PRO (Carestream Health Inc., CT).

Los productos de PCR se purificaron con el equipo Accuprep® PCR Purification Kit (Bioneer, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones utilizando los primers descritos anteriormente, utilizando el Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las indicaciones del fabricante, en un equipo 3500 ABI genetic analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron editadas usando Bioedit Sequence Alignment Editor V 7.0.4.1 e identificadas preliminarmente por similitud utilizando el algoritmo BLASTn (National Center for Biotechnology Information, Washington, DC) con parámetros ajustados automáticamente.

Análisis filogenético. Para los análisis filogenéticos, se incluyeron secuencias de referencia de las cepas tipo de miembros del género *Scedosporium* y especies relacionadas de la familia Microascaceae obtenidos de GenBank (Tabla 5). Las alineaciones iniciales de la región ITS y del gen *BT2* se realizaron por separado y luego combinados para los análisis de filogenia.

Tabla 5. Fuentes, orígenes geográficos y números de acceso de GenBank / EMBL / DDBJ de los aislados incluidos en este estudio.

Aislado	Nº de Cultivo	Fuente	Origen	Número de acceso	
				BT2	ITS
<i>Parascedosporium tectonae</i>	CBS 120.338	Suelo de jardín Buenos Aires	Argentina	AM409105	AM409113
<i>Petriellopsis africana</i>	CBS 311.72T	Suelo arenoso	Namibia	AJ889603	AJ888425
<i>Scedosporium angustum</i>	CBS 254.72T	Tanque de aguas residuales Ohio	USA	AJ889604	AJ888414
<i>Scedosporium boydii</i>	CBS 101.22T	Micetoma Texas	USA	AJ889590	AJ888435
<i>Scedosporium desertorum</i>	CBS 489.72T	Suelo de marisma	Kuwait	AM409106	AM409101
<i>Scedosporium ellipsoideum</i>	CBS 418.73T	Suelo	Tayikistán	AJ889595	AJ888426
<i>Scedosporium fusoidesum</i>	CBS 106.53T	Estiércol de cabra Aligarh	India	AJ889601	AJ888428
<i>Scedosporium apiospermum</i>	FMR 8619 T	Queratitis	Brasil	AJ889584	NR130664
<i>Scedosporium minutisporum</i>	FMR 4072T	Sedimento de río Tordera	España	AJ889592	AJ888384
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	FMR 8630T	Úlcera de tobillo S. Compostela	España	AJ889597	AJ888440
<i>Scedosporium dehoogii</i>	CBS 117406T	Suelo de jardín, Barcelona	España	KT163401	KT163400
<i>Scedosporium cereisporum</i>	FMR 12996T	Lodos de aguas residuales, Mûrs-Erignés	Francia	KJ599659	KJ599660
<i>Lomentospora prolificans</i>	FMR 7294T	Clínica California	USA	AJ889591	AJ888444
<i>Petriella setifera</i>	CBS 385.87	Uña humana Helsinki	Finlandia	EU977491	AY882345
<i>Petriella sordida</i>	UTHSC 03-394	Infección nasal California	USA	AM409104	AM409114
<i>Pseudallescheria boydii</i> (<i>Indiella americana</i>)	CBS 218.35	Micetoma de pie humano	Paraguay	s/n	AM712309

Abreviaturas: CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; FMR: Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, España; UTHSC: Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, EEUU. s/n: Sin número asignado, la secuencia fue determinada en este estudio, ver anexo II

La construcción de árboles filogenéticos se llevó a cabo con el algoritmo de máxima verosimilitud con el modelo que mejor ajustaba a los datos, Kimura 2 parámetros, utilizando una distribución gamma para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre

sitios, obtenidos con el programa jModeltest 2.1.9 (57) y considerando a los gaps como deleciones completas. Se utilizó la técnica de Bootstrap como soporte, con 1000 pseudoréplicas, y se consideraron significativos valores mayores al 75% utilizando el programa Mega versión 6 (58). Las secuencias de *Parascedosporium tectonae* CBS 120.338 se utilizaron para enraizar el árbol. Se utilizaron posteriormente dichas secuencias para estimar las distancias evolutivas entre las distintas especies mediante el algoritmo de Neighbor joining utilizando el programa Mega versión 6.

Pruebas de sensibilidad *in vitro*. La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue realizada según el documento de referencia M38-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (59). Todos los aislados fueron ensayados frente a AB, IZ y VZ (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina), caspofungina (CP) y posaconazol (PZ) (Merck, Buenos Aires, Argentina), anidulafungina (AN) (Pfizer, Buenos Aires, Argentina) y micafungina (MC) (Astellas, Tokio, Japan). Para la AB y triazoles se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), que inhibe el 100% del crecimiento, mientras que para las EC, la concentración efectiva mínima (CEM), es la concentración en la que se visualiza hifas con menor desarrollo, redondeadas y compactas, comparadas con el control de crecimiento.

Teniendo en cuenta que no existen puntos de corte clínicos y que los valores de corte epidemiológicos propuestos por el CLSI, en su documento Epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing, M-59 (60), no incluyen al género *Scedosporium*, no se pueden hacer interpretaciones categóricas, por lo que se calculó la media geométrica, moda, rango, la CIM₅₀ y CIM₉₀. Como controles de calidad de los ensayos se utilizaron *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 y *Aspergillus flavus* ATCC 204304.

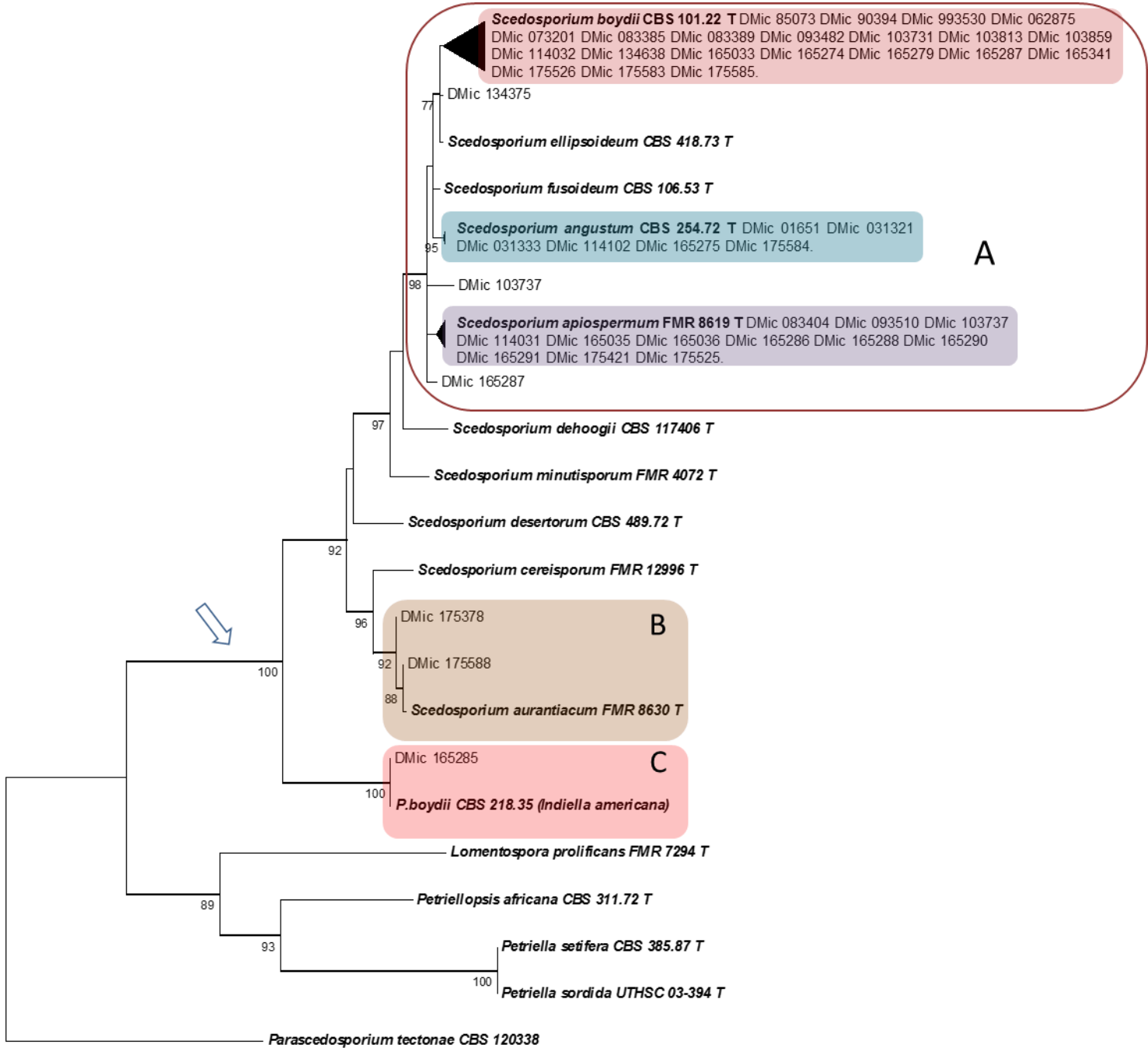
Resultados

En esta tesis se presentan los resultados de un estudio fenotípico y filogenético de 43 aislados de *Scedosporium* de origen clínico de la colección DMic de Argentina. Todos los aislamientos clínicos se identificaron fenotípicamente como *Scedosporium* / *Pseudallescheria*, únicamente en base a caracteres morfológicos y fueron sometidas a análisis moleculares y fisiológicos. Estos análisis permitieron identificar con un enfoque polifásico, metodología de identificación de referencia, a los aislados estudiados (Tabla 4). Todos los aislamientos de *Scedosporium* y especies cercanas de su familia se incluyeron en el análisis para determinar los límites de especie y relaciones evolutivas. Se amplificaron regiones de 533 pb para ITS y 492 pb para *BT2*, con un total de 1025 nucleótidos para ambos loci. Las secuencias de los dos genes se analizaron filogenéticamente como conjuntos de datos separados y combinados. El árbol filogenético de datos combinados, muestra que los aislados clínicos se ubicaron en tres clados, como se muestra en la Figura 3. Los clados A, B y C están comprendidos en un grupo monofilético con bootstrap de 100, cuyo nodo se indica con una flecha en la Figura 3.

El clado A, soportado con un bootstrap de 98, está integrado por las especies del “complejo de especies *S. apiospermum*” donde se ubican la mayoría de los aislados DMic: 20 (46,5%) relacionados con *S. boydii* CBS 101.22 T; 11 (25,6%) relacionados con *S. apiospermum* FMR 8619 T; 6 (14,0%) con *S. angustum* CBS 254.72 T; y 3 aislados se ubicaron en subclados menos definidos, 2 (4,6%) de ellos cercanos al subclado *S. apiospermum* FMR 8619 T y 1 (2,3%) cercano a *S. ellipsoideum* CBS 418.73 T.

Por otra parte, el clado B, soportado con un bootstrap de 92, corresponde a *S. aurantiacum*, que incluye a la especie tipo FMR 8630T y a los 2 (4,6%) aislados DMic 175378 y 175588.

Por último, se define el clado C con un soporte de bootstrap de 100 y está integrado por DMic 165285 y CBS 128.35, una rama filogenéticamente distante del “complejo S. *apiospermum*” y de las otras especies de *Scedosporium*.



0.02

Figura 3. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir del conjunto de datos de secuencias de ADN combinado de dos loci (ITS y *BT2*) de los aislados DMic y secuencias de cepas de referencia obtenidas de GenBank. En los nodos se presentan los valores de soporte de bootstrap $\geq 75\%$. Se representan con las letras A, B y C los clados en los que se ubicaron los aislados DMic. La flecha indica un clado monofilético con 100% de Bootstrap en donde se ubican las especies de *Scedosporium*.

Todos los aislados crecieron a 25 y 37°C, a 40°C crecieron 39 de los 43 estudiados. De los cuatro aislados que no crecieron a 40°C, tres, correspondieron al clado A, identificadas como *S. boydii* (DMic 07320 y DMic 103731) y *S. angustum* (DMic 134375); y uno correspondió al clado C (DMic 165285), que además presentó un desarrollo más lento que el resto a 25°C y 37°C.

Ninguno de los aislados creció a 45°C, incluyendo a aquellos identificados como *S. aurantiacum* (DMic 175378 y DMic 175588). Aunque la capacidad de crecimiento a 45°C para esta especie ha sido descrita como un carácter que la diferencia del resto, nuestras cepas alcanzaron la máxima temperatura de crecimiento solo hasta 42°C (Anexo I). En concordancia con lo descrito para esta especie, ambas presentaron un pigmento amarillo característico en ambos medios (Figura 4). La cepa DMic 175588 presentó, además de los 2 anamorfos característicos del género, una conidiogénesis aberrante tipo "*Polycytella*" (mutante de *S. apiospermum*) (Figura 4 c - d y Figura 5).

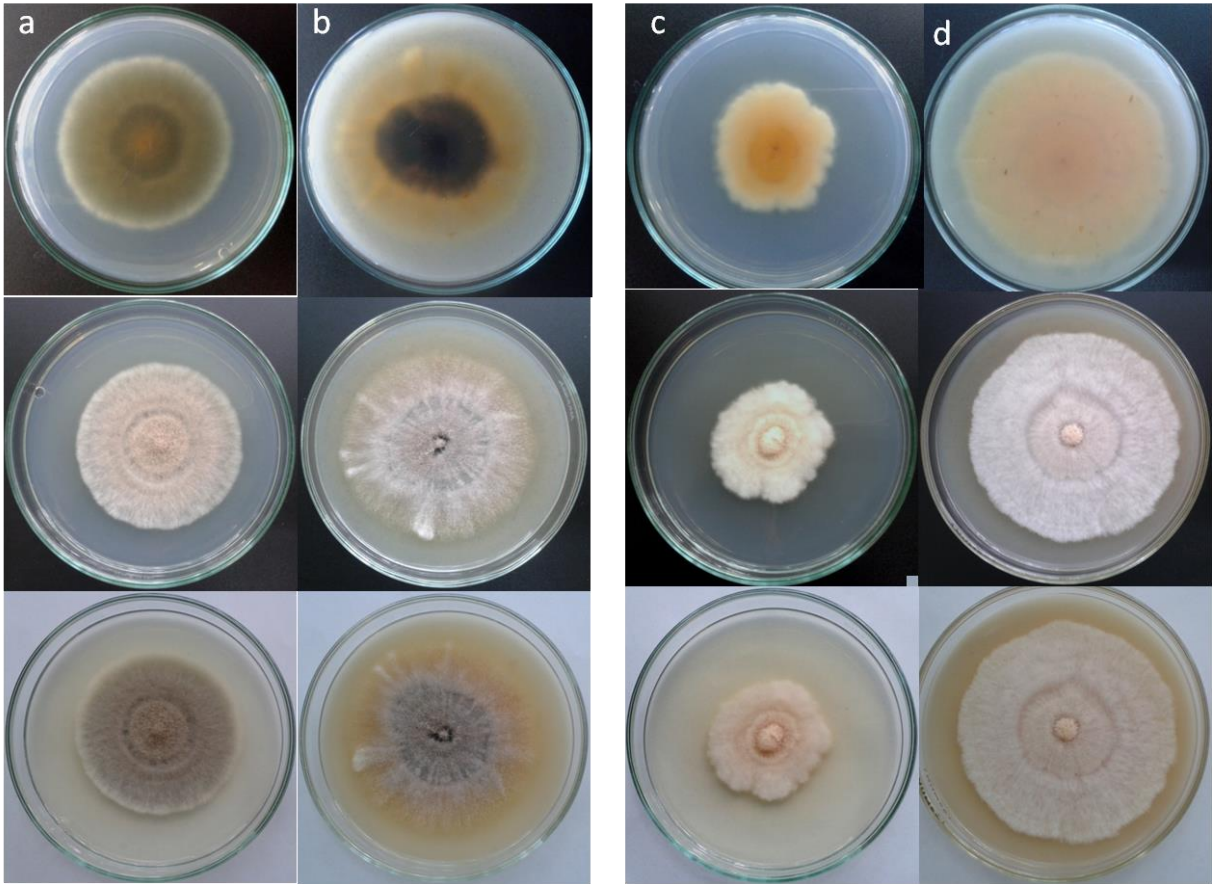


Figura 4. Colonias de *S. aurantiacum* 14 días a 25°C. Columnas a y b. DMic 175378 a. PDA b. OA. Columnas c y d. DMic 175588 c. PDA d. OA

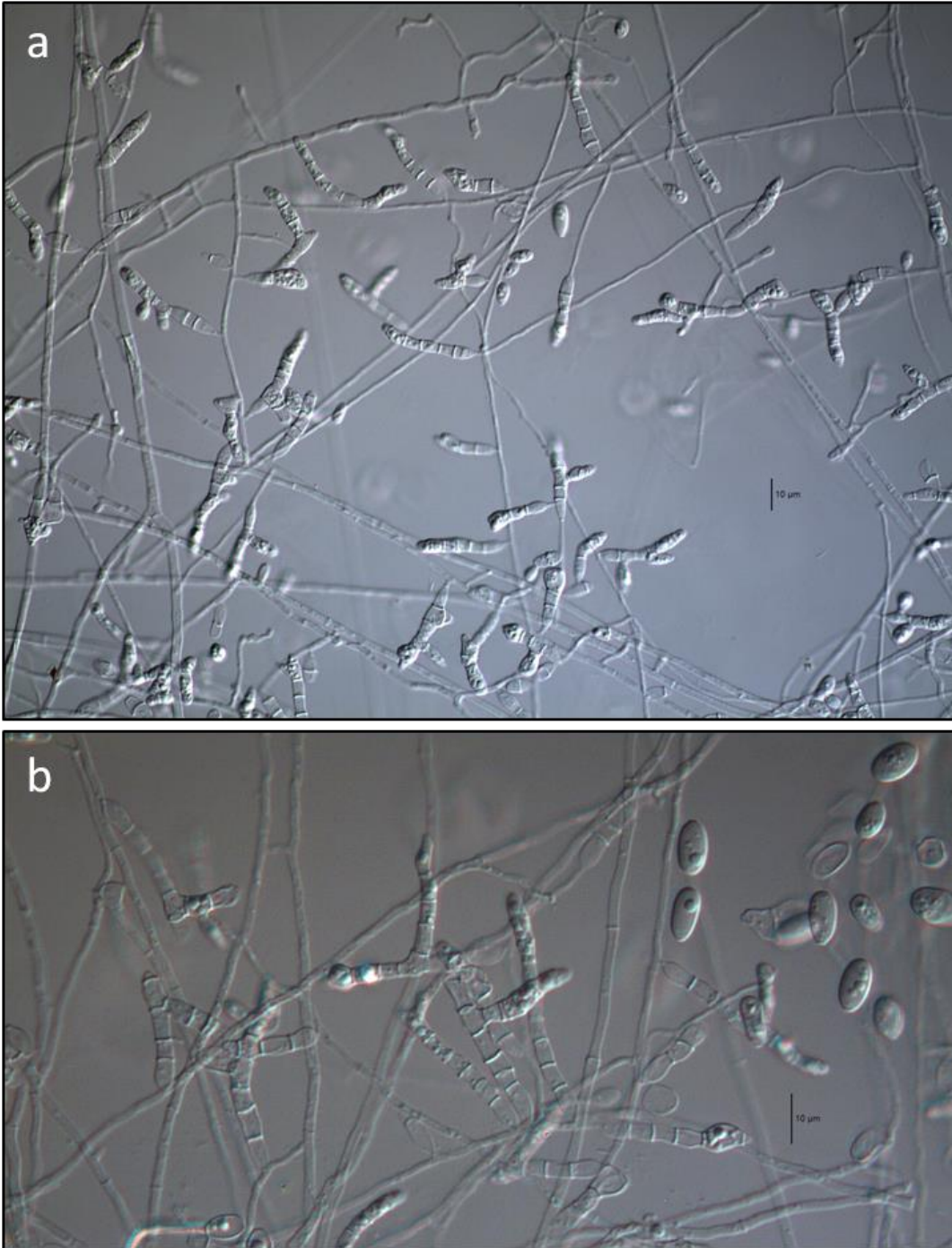


Figura 5. *S. aurantiacum* DMic 175588 a. Conidiogénesis aberrante, los conidios salen directamente sobre la hifa. b. Conidios aberrantes y conidios originados en anélides característicos de *Scedosporium*.

Todos los aislados estudiados presentaron el típico anamorfo *Scedosporium*, 21 aislados presentaron además ascomas en PDA y OA, 16 correspondieron a *S. boydii* y 5 a *P. angusta* (*Scedosporium apiospermum species complex*). Los que desarrollaron anamorfos sinematosos en ambos medios fueron 9: 4 aislados de *S. apiospermum*, 2 de *S. boydii* y los dos *S. aurantiacum*, DMic 165285, los formó en OA luego de los 14 días y en PDA luego de 28 días, son de menor tamaño que el resto y menos desarrollados (Anexo I).

Todos presentaron en mayor o menor medida el desarrollo de conidios que nacen directamente desde las hifas. En particular, la cepa DMic 165285 los produjo luego de 14 días en OA y muy escasamente en PDA. A diferencia del resto de los aislados, este produjo conidios claviformes, los mismos nacen predominantemente desde células conidiógenas diferenciadas.

La cepa CBS 218.35 fue incluida en el estudio morfológico, dada la similitud que mostró con DMic 165285 cuando se analizaron los caracteres moleculares (Clado C de la Figura 3). Tanto DMic 165285 como CBS 218.35 presentaron velocidades de crecimiento inferiores al resto de las especies estudiadas y similares entre sí en OA y PDA (Tabla 6). La temperatura máxima de crecimiento para ambas fue de 39°C. La cepa CBS 218.35 presentó menos esporulación que DMic 165285, presentó mayor cantidad de conidios sésiles que nacen desde hifas indiferenciadas y escasas células conidiógenas anelídicas con conidios solitarios o en cabezas húmedas. Se observó también fragmentación tálica del micelio vegetativo y en las hifas fértiles que involucraron a células conidiógenas, las cuales se vieron más melanizadas. Esta característica la diferencia de nuestro aislado y puede atribuirse a un proceso degenerativo de CBS 218.35.

DMic 165285 mostró una mayor producción de conidios desarrollados en células conidiógenas anelídicas. Los conidios de esta especie fueron mayormente claviformes, melanizados, de pared gruesa y con gútulas, en ambos aislados se presentan así, aunque es difícil compararlos, dado el escaso número producido por CBS 218.35, estos tienen un

largo que alcanza 11 μm , inferiores a DMic 165285 que llegan a medir 13,6 μm , mientras que los conidios sésiles presentaron la misma forma y tamaño en ambos aislados.

Se observaron conidios tálicos en forma de fósforo, como los descritos en *S. cereisporum* en ambos aislados (15). La comparación de las características culturales y la micromorfología de ambas se muestran en las Figuras 6, 7 y 8. Teniendo en cuenta las características morfológicas y los agrupamientos filogenéticos, nuestros resultados demuestran que el clado C representa una especie diferente de las que hasta ahora se aceptaron dentro del género *Scedosporium*, y por lo tanto la proponemos como especie nueva.

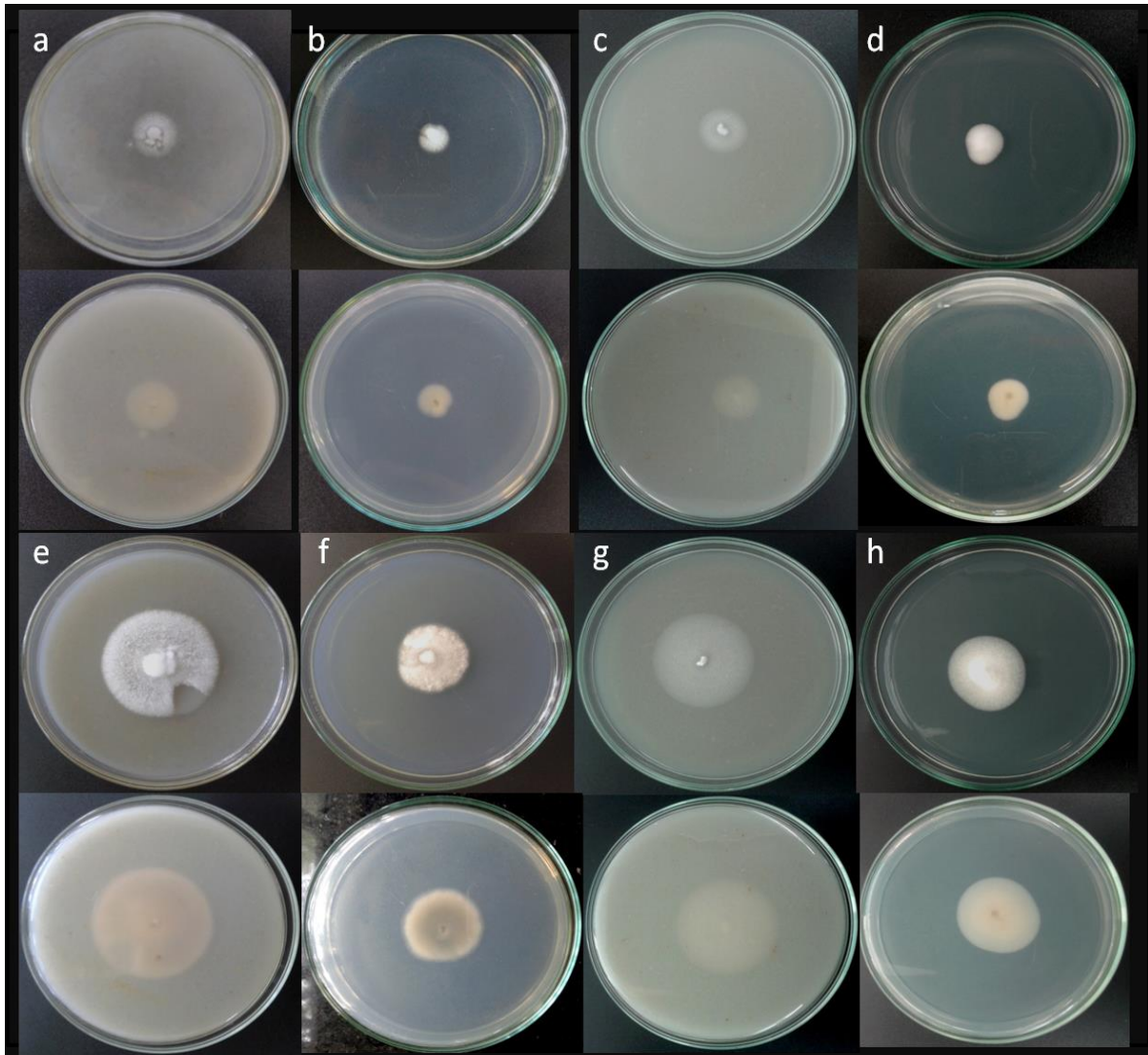


Figura 6. Colonias de DMic 165285 y CBS 218.35 sobre PDA y OA a 25°C. a, b, e y f.: DMic 165285. a. OA 7 días; b. PDA 7 días; e. OA 14 días; f. PDA 14 días; c, d, g y h: CBS 218.35. c. OA 7 días; d. PDA 7 días; g. OA 14 días; h. PDA 14 días.

Tabla 6. Diámetros (mm) de las colonias a 25°C en OA y PDA de DMic 165285 y CBS 218.35

	OA		PDA	
	DMic 165285	CBS 218.35	DMic 165285	CBS 218.35
7 días	18	18	14	15
10 días	32	27	22	21
14 días	43	38	30	30

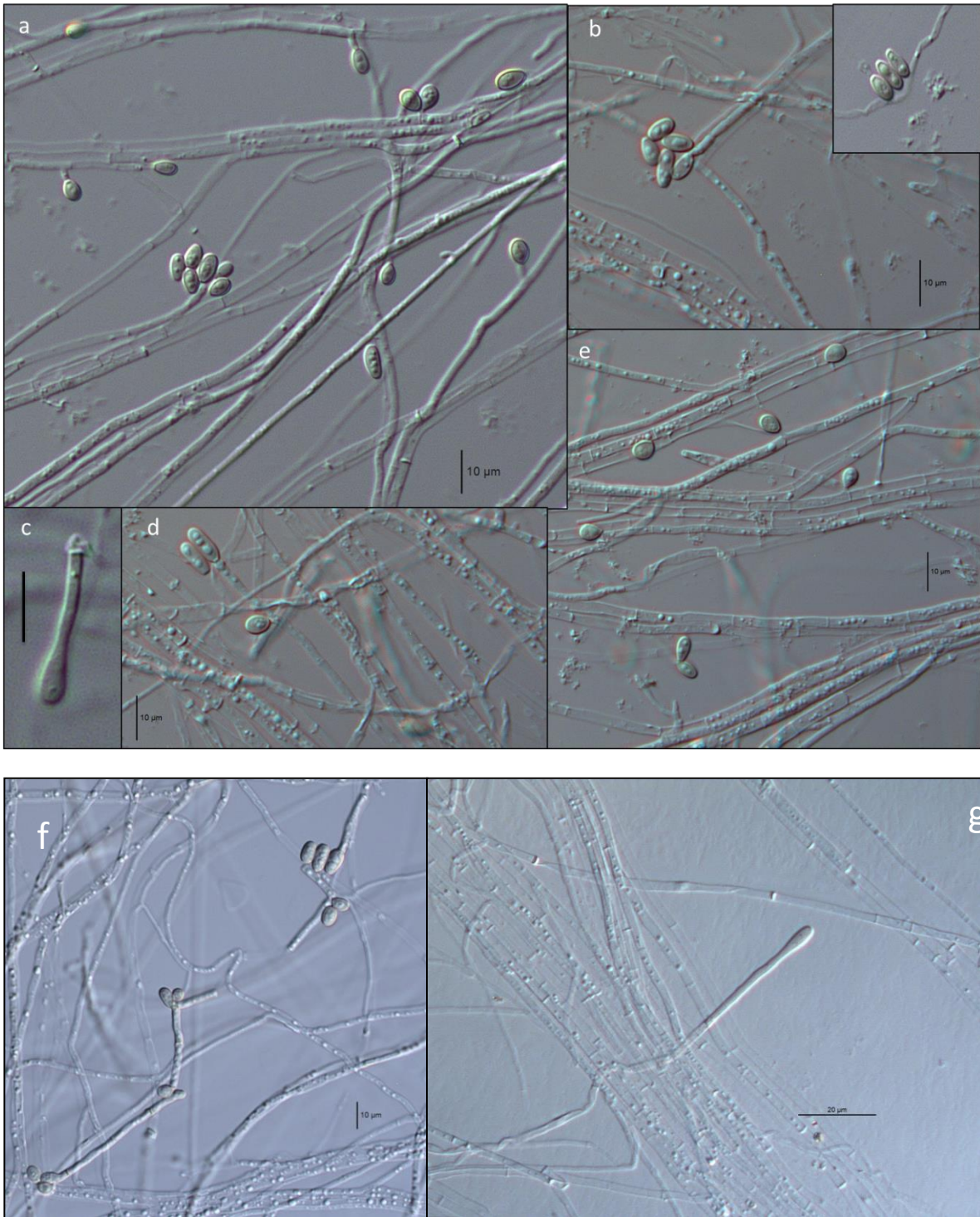


Figura 7. Micromorfología de CBS 218.35, 14 días a 25°C sobre OA. a, d y e. Conidios anelídicos y sésiles. b. conidios anelídicos. c. Conidio tálico. f y g. Fragmentación tálica en micelio y células conidógenas. Barra 10µm

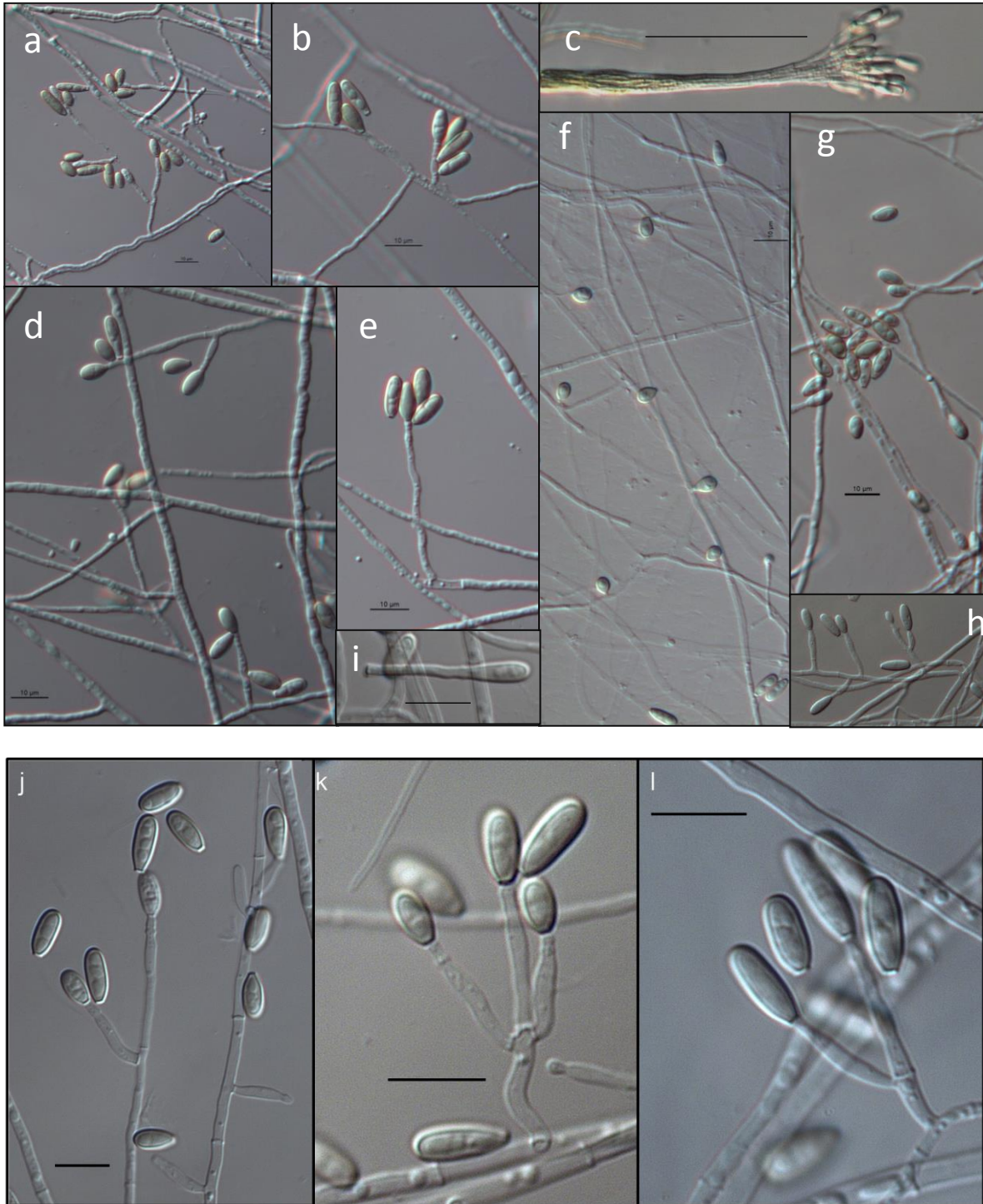


Figura 8. Micromorfología de DMic 165285, 14 días a 25 °C sobre OA. a, b, d, e, g y h. Células conidiógenas anelídicas y conidios. f. Conidios sésiles que nacen desde hifas indiferenciadas. c. Sinema en formación, barra 50 µm. i. conidio tálico, barra 10 µm. j, k y l. Detalle de células conidiógenas anelídicas y conidios, barra 10 µm.

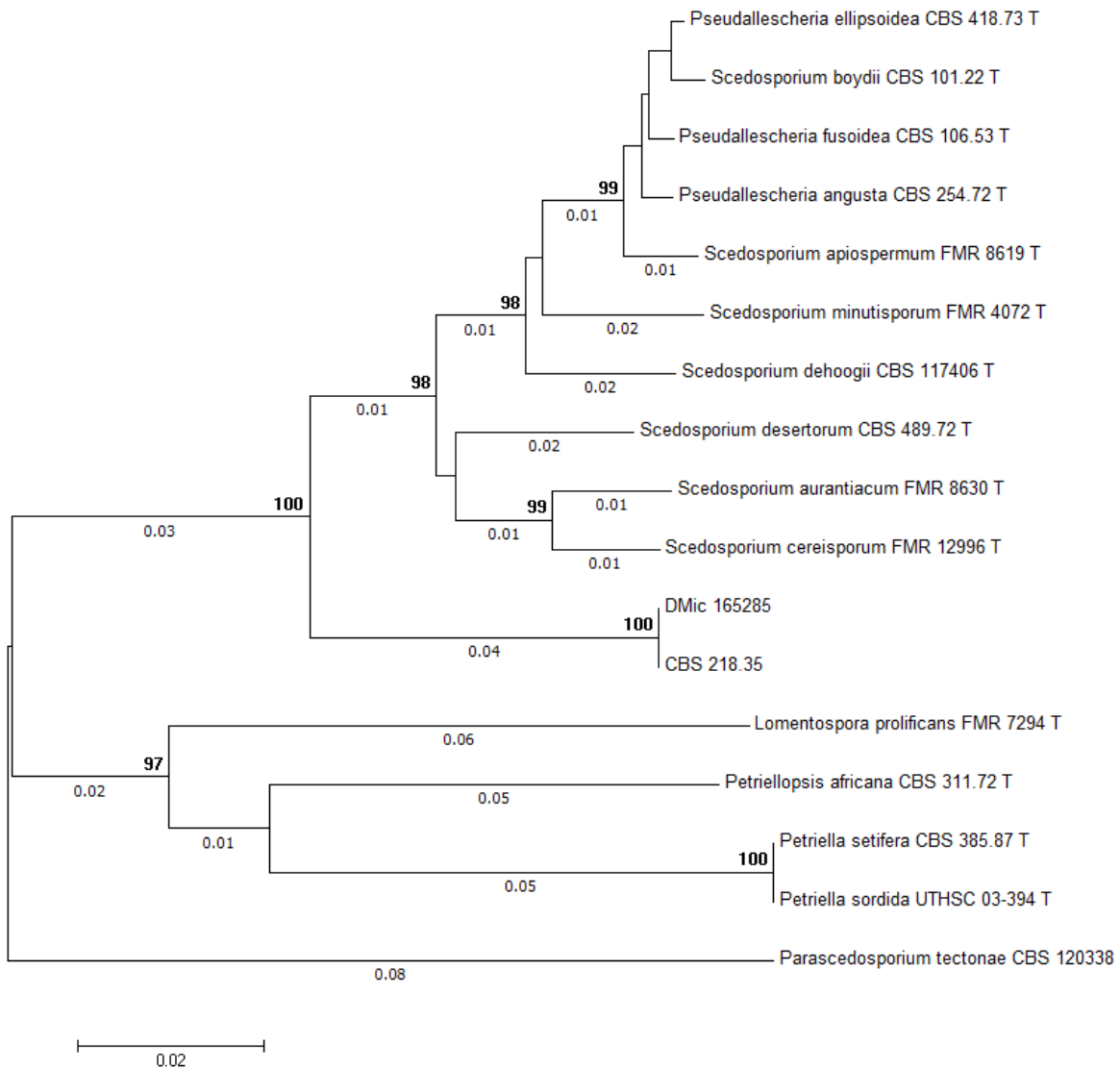


Figura 9. Árbol filogenético obtenido a partir del conjunto de datos de secuencias de ADN combinado de dos loci (ITS y *BT2*) de los aislados DMic 165285 y CBS 128.35 y secuencias de cepas de referencia obtenidas de GenBank, mediante Neighbor joining. En los nodos se presentan los valores de soporte de bootstrap $\geq 95\%$ resaltados en negrita y en las ramas las distancias $\geq 0,005$. La barra muestra las unidades del número de sustituciones por sitio.

El árbol filogenético de la Figura 9, muestra los estimadores de distancia evolutiva en números de sustituciones por sitio de las especies estudiadas. La distancia entre las especies de los géneros diferentes a *Scedosporium* y cualquiera de las especies

tradicionales de este género toma valores de 0,14 y 0,15 sustituciones por sitio. La distancia entre DMic 162585 y las especies de *Scedosporium* toma valores entre 0,07 y 0,08, mientras que con especies de géneros distintos a *Scedosporium* es de 0,15. Esto sugiere que DMic 162585 está más cercano al género *Scedosporium* que al resto de las especies de otros géneros relacionados, pertenecientes a Microascaceae.

Scedosporium clavisporum Abrantes, Refojo, Hevia, Fernández, Stchigel sp. nov.

Material examinado: DMic 165285

Etimología. De latín clava-, clava, y -spora, espora, debido a la forma de los conidios que nacen de células conidiógenas con desarrollo anelídico.

Las colonias en PDA después de 10 días a 25°C alcanzan un diámetro de 20 - 25 mm, son algodonosas, el centro un poco más elevado y lanoso, grisáceas con zonas levemente amarronadas, usualmente con un borde blanquecino irregular y fimbriado, el reverso es marrón oliváceo en el centro y marrón grisáceo a incoloro hacia la periferia.

Las colonias en OA después de 10 días a 25°C alcanzan un diámetro de 30 - 33 mm, son densas y algodonosas, el centro un poco más elevado, de lanoso a flocoso, blancas, con zonas levemente grisáceas, usualmente con bordes lobados, el reverso es marrón claro en el centro y grisáceo a incoloro hacia la periferia.

No produce pigmento difusible sobre PDA y OA.

Los conidióforos se encuentran solitarios a menudo se reducen a una célula conidiógena que crece lateralmente sobre el micelio indiferenciado o ramificado, portando en ocasiones verticilos de dos a tres células conidiógenas. Las células conidiógenas son percurrentes (anélides), laterales o terminales, hialinas, de pared lisa, cilíndricas o en forma de frasco, de 5 - 16 µm de largo por de 1,5 - 2,5 µm de ancho. Conidios solitarios o en cabezas húmedas, ovoides cuando jóvenes, hialinos a sub-hialinos de 7,5 - 8,8 x 3,8 - 4,5 µm, luego marrones, lisos y de pared gruesa, gutulados, elipsoidales a claviformes de

base truncada de 10 - 13,6 x 3,1 - 4,8 μm , los conidios sésiles desde hifas indiferenciadas son muy escasos a los 7 días en PDA, pero luego de los 14 días comienzan a desarrollar. En OA son más abundantes, ovoides, de 5,4 - 6,8 x 4,2 - 4,8 μm , también desarrollan de proyecciones cortas.

Anamorfo sinematoso poco desarrollado luego de 14 días en OA, más desarrollados en PDA luego de 4 semanas, alcanzan un largo de 210 μm . Los conidios son claviformes de 11 - 17 x 3,3 - 3,8 μm .

No presenta estado teleomorfo.

El rango de temperatura óptima de crecimiento fue de 25°C - 30°C.

Colonias en PDA y OA a 25°C después de 7 días alcanzan un diámetro de hasta 13 - 14 mm y 18 - 20 mm respectivamente.

Colonias en PDA y OA a 25°C después de 14 días alcanzan un diámetro de 30 - 32 mm y 40 - 45 mm y respectivamente.

Colonias en PDA y OA a 37°C después de 7 días alcanzan un diámetro de hasta 5 - 6 mm y 9 - 10 mm respectivamente.

Temperatura máxima de crecimiento: 39°C. No crece a 40°C.

En la Figura 10 se muestran las características macroscópicas de cultivos en OA Y PDA de DMic 165285.

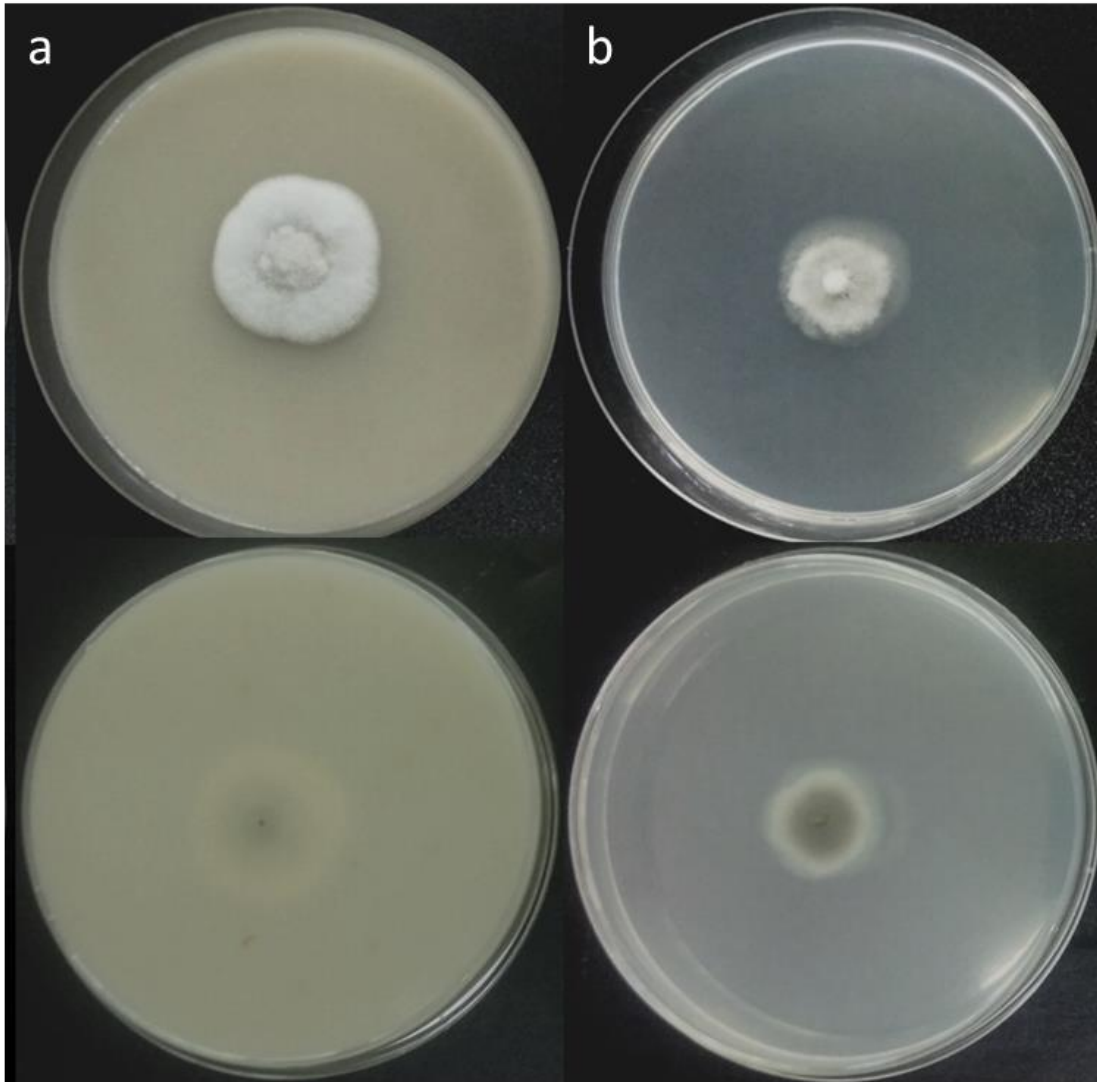


Figura 10. Colonias de DMic 165285 en OA y PDA 10 días a 25°C. a. Anverso y reverso en OA. B. Anverso y reverso en PDA.

El aislado se recuperó de una lesión de mano de un hombre, de 76 años de edad, herrero de oficio, nacido en la ciudad de Salta, en donde reside actualmente. Padece diabetes tipo II, sin otros antecedentes de enfermedad, no recuerda algún traumatismo importante, excepto alguna viruta de metal con el que trabaja. La fecha de inicio de los síntomas data del año 1998 y al día de hoy, la lesión muestra compromiso óseo. Figura 11.

El aislamiento fue recuperado de 2 muestras, la primera de una biopsia y la segunda, de una secreción de la única herida tipo fístula que presentaba al momento de la toma de muestra. En ninguna de las 2 muestras se observaron granos eumicóticos a pesar de que la lesión presentaba un aspecto micetoide. En el examen directo de la secreción se observaron hifas hialinas tabicadas, el hongo desarrolló en todos los cultivos



Figura 11. a y c. Lesión de mano. a. Aspecto de la lesión actual donde se observan 3 bocas fistulares cicatrizadas, marcadas con flecha. c. Aspecto de la lesión tomada en 2016, la flecha muestra una boca fistular. b. Cultivos con desarrollo de muestras de biopsia y secreción. d y e. Radiografías en donde se puede observar osteólisis a nivel del carpo.

Clave para las especies tratadas del género *Scedosporium*:

- 1 a. Ascoma presente. 2
- 1 b. Ascoma ausente. 3
- 2 a. Ascoma con apertura setosa preformada. *Petriella setifera*
- 2 b. Ascoma sin apertura preformada. *S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. minutisporum*
- 3 a. Células conidiógenas cilíndricas, libres o intercalares, colonias grises a marrones, con o sin pigmento amarillo difusible en el agar. 4
- 3 b. Células conidiógenas infladas en la base, agregadas en forma de cepillo, colonias marrón negruzco, reverso marrón oscuro. *Lomentospora prolificans*
- 4 a. Reverso de la colonia en PDA con tonos naranjas a 25°C pigmento difusible amarillo 5
- 4 b. Reverso de la colonia sin tonos naranjas. Sin pigmento amarillo. 6
- 5 a. No crece a 40°C. *Scedosporium cereisporum*
- 5 b. Crece a 40°C. *Scedosporium aurantiacum*
- 6 a. No crece a 40°C. 7
- 6 b. Crece a 40°C. *S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. minutisporum*
- 7 a. Colonias de 14 días en PDA a 25°C mayores a 40mm, conidios de células conidiógenas anelídicas mayormente ovoides. *Scedosporium dehoogii*
- 7 b. Colonias de 14 días en PDA a 25°C menores a 40mm, conidios de células conidiógenas anelídicas mayormente claviformes. *Scedosporium claviforme*

En la tabla 7 se resume la media geométrica, el rango, la CIM₅₀ y la CIM₉₀ de todos los antifúngicos evaluados. Para el resto de las especies, no poseemos el número de aislados suficiente para la comparación de datos, es por esta razón que se expresa sólo el valor de la CIM. Como no se han establecido aún ni los puntos de corte epidemiológicos y, menos aún, los puntos de corte clínicos, sólo con fines analíticos y teniendo en cuenta la bibliografía disponible consideramos los siguientes puntos de corte, para la AB, IZ y VZ CIM \geq 2 mg/L, para PZ \geq 0,25 mg/L y para las EC \geq 0,5 mg/L (59–66). En general, para el 65% (28/43) de los aislados estudiados se observó un valor de CIM \geq 2 mg/L para la AB, y un 35% (15/43) para IZ. El VZ resultó ser el antifúngico más activo frente a 40 de 43 aislados, ya que el 100% de *S. angusta* (6/6), el 100% de *S. aurantiacum* (2/2), el 95 % de *S. boydii* (20/21) y el 83 % de *S. apiospermum* (10/12) presentaron una CIM \leq 2 mg/L para este antifúngico. Respecto al PZ, se registraron CIM \geq 0,25 mg/L en el 67% (4/6) de los aislados de *P. angusta*, 100% (2/2) de *S. aurantiacum* (2/2), 75% (9/12) de *S. apiospermum* y 52% (11/21) de *S. boydii*.

La anidulafungina (AN) y la caspofungina (CP) evidenciaron escasa actividad *in vitro*, ya que el 81% (35/43) y 74% (32/43) de los aislados presentaron valores de CIM \geq 0,5 mg/L, respectivamente. Sin embargo, sólo el 40% (17/43) de los aislados presentaron esos valores de CIM para micafungina (MC).

La cepa CBS 218.35 fue estudiada por fuera del análisis conjunto de cepas DMic, los valores de CIM se muestran junto con DMic 165285 en la tabla 7.

Tabla 7. Valores de CIM de siete antifúngicos frente a *Scedosporium* spp. (n=44).

<i>Pseudallescheria angusta</i> n=6							
	AB	IZ	VZ	PZ	AN	CP	MC
moda	1,00	0,25	0,25	0,06	2,00	4,00	0,50
GM	2,83	0,89	0,28	0,31	2,30	3,48	0,57
rango	1-8	0,25-8	0,06-1	0,06-2	1-4	0,5-32	0,125-8
CIM 50	4,00	1,00	0,25	0,50	2,00	4,00	0,50
CIM 90	8,00	8,00	1,00	2,00	4,00	32,00	8,00
<i>Scedosporium apiospermum</i> n=12							
	AB	IZ	VZ	PZ	AN	CP	MC
moda	8,00	0,50	0,50	0,50	4,00	1,00	0,13
GM	2,67	1,19	0,42	0,47	1,18	0,99	0,53
rango	0,5-16	0,125-16	0,125-4	0,125-16	0,015-16	0,03-16	0,015-16
CIM 50	4,00	1,00	0,50	0,50	4,00	1,00	0,50
CIM 90	8,00	8,00	4,00	1,00	8,00	16,00	8,00
<i>Scedosporium boydii</i> n=21							
	AB	IZ	VZ	PZ	AN	CP	MC
moda	4,00	0,50	0,13	0,06	4,00	4,00	0,25
GM	1,87	0,48	0,18	0,19	0,93	0,76	0,23
rango	0,125-8	0,03-8	0,03-4	0,03-1	0,03-8	0,015-16	0,015-8
CIM 50	2,00	0,50	0,13	0,25	2,00	2,00	0,25
CIM 90	8,00	8,00	0,50	1,00	4,00	4,00	1,00
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i> n=1							
	AB	IZ	VZ	PZ	AN	CP	MC
CIM _{DMic 134375}	0,25	32,00	0,25	0,015	0,02	0,02	0,02
<i>Scedosporium aurantiacum</i> n=2							
	AB	IZ	VZ	PZ	AN	CP	MC
CIM _{DMic 175378}	16,00	2,00	0,50	1,00	8,00	16,00	8,00
CIM _{DMic 175588}	8,00	4,00	0,50	1,00	4,00	8,00	8,00
<i>Scedosporium clavisorum</i> sp. nov. n=2							
	AB	IZ	VZ	PZ	AN	CP	MC
CIM _{DMic 165285}	8	1	0,5	1	1	2	0,5
CIM _{CBS 218.35}	4	0,5	0,25	0,25	2	1	0,25

CIM: concentración inhibitoria mínima (mg/L); MG, media geométrica; CIM₉₀, concentración que inhibe el 90% de los aislados; CIM₅₀, concentración que inhibe el 50% de los aislados. AB: anfotericina B; IZ: itraconazol; VZ: voriconazol; PZ: posaconazol; AN: anidulafungina; CP: caspofungina; MC: micafungina.

Discusión

El análisis de los caracteres moleculares, morfológicos y fisiológicos de aislados clínicos de *Scedosporium* mostró que la mayoría (40 de 43 aislados) se ubicaron principalmente dentro del clado A, relacionados con *S. boydii*, *S. apiospermum* y *S. angustum*, en donde se agrupan las especies consideradas “Complejo de especies *S. apiospermum*”. Estas especies, que en su estado anamorfo son morfológicamente similares, que no siempre presentan su estado teleomorfo en cultivo y mayormente crecen a 40°C. En concordancia, en este estudio 37 de 40 aislados del complejo mostraron crecimiento a esa temperatura. Los tres aislados que no desarrollaron a 40°C, no presentaron ninguna particularidad en cultivo, creemos que esta ausencia de crecimiento se relaciona con características individuales de estos aislados.

El clado A es claramente monofilético y está bien soportado con un bootstrap de 98%, pero las ramas internas son diversas y están poco soportadas, lo que sugiere que existe una gran variabilidad genética intraespecífica de los aislados clínicos DMic que están dentro del complejo, lo cual concuerda con todos los trabajos que se realizaron sobre el género (16).

En este sentido, puede verse que tres aislados se ubicaron filogenéticamente en el mismo clado pero en ramas separadas de *S. boydii*, *S. apiospermum* y *S. angustum*; dos de ellos más cercanos a *S. apiospermum* FMR 8619T y mientras que el otro, DMic 134375, se encuentra formando una única rama dentro del complejo junto con *S. ellipsoideum* CBS 418.73 T. Esto puede deberse a la diversidad intraespecífica dentro del complejo que, si bien permite que algunos de los integrantes se asocien a especies con epíteto específico definido, deja a otros aislados dentro del complejo pero sin asociación clara a ninguna de ellas.

Los aislados DMic 165288 identificado como *S. apiospermum* y DMic 175526 identificado como *S. boydii* fueron recuperados de un mismo paciente con enfermedad pulmonar con

un año de diferencia, por lo que fueron asumidos como eventos separados. La recuperación de agentes diferentes desde un mismo pacientes puede deberse a una co-colonización de ambas en las vías respiratorias o a dos eventos infecciosos superpuestos. *S. apiospermum* DMic 175421, es el único aislado clínico que no fue recuperado de muestras humanas, ya que fue aislado de una lesión de caparazón de tortuga marina (*Chelonia mydas*). Existen reportes sobre aislamientos de *Scedosporium* de cáscaras de huevos y de cloaca de esta especie de tortuga, por lo que este hallazgo coincide con lo descrito sobre la capacidad del hongo para vivir en ambientes salinos (67).

El clado B está representado por la secuencia de la especie tipo *S. aurantiacum* FMR 8630 T y dos aislamientos que provenían de esputos de pacientes con FQ. El primer aislado, DMic 175378, fue recibido a finales de 2016, proveniente de un paciente de 11 años de edad, oriundo de la provincia de Santa Fe, en donde se trató hasta los 10 años, momento en que fue derivado a la Ciudad de Buenos Aires por agravamiento del cuadro clínico, mostrando gran compromiso de la función pulmonar y hepática. El paciente falleció a principios de 2017. El segundo aislado, DMic 175588, fue recibido a mediados de 2017, proveniente de un paciente de 27 años de edad, diabético, con buen estado general de salud, oriundo de la Ciudad de Buenos Aires, con antecedente de viaje a la zona de Egipto y Europa.

Lo interesante de este último aislado es que presenta una conidogénesis aberrante que coincide con la descrita anteriormente como mutante tipo "*Polycytella*". En 1987, Campbell y cols. describen una nueva especie, "*Polycytella hominis*" proveniente de micetoma humano, y reportan la semejanza que tienen los granos producidos por esta especie y los que produce *P. boydii*, advirtiendo también que en la contraelectroforesis, el suero del paciente mostró precipitinas cuando se enfrentó al antígeno de *P. boydii* (68). En el año 2006, Borman y cols. demostraron que *P. hominis* es genéticamente indistinguible de *S. apiospermum* y que se trata de una mutante de

esporulación, en la que se produce un cambio en el control genético del desarrollo conidial. A raíz de este trabajo, *P. hominis* es considerado como un sinónimo de *S. apiospermum* (69). Por ello, *S. aurantiacum* DMic 175588 es el primer hallazgo de esta mutante de esporulación en especies distintas de *S. apiospermum*, por lo que podría presentarse en las otras especies del género. La particularidad de este aislado es que no deja de producir los conidios característicos de la especie en los dos estados anamórficos, tanto en células conidiógenas solitarias, como en las agrupadas en sinemas. Estas características no estaban presentes en la mutante tipo "*Polycytella*" de *S. apiospermum* que solo desarrollaba conidios aberrantes.

Estos son los primeros aislamientos de *Scedosporium aurantiacum* en nuestro país y en el continente americano, ya que no ha sido reportado ni en muestras ambientales ni en muestras clínicas. Para el caso del aislamiento desde el ambiente, la recuperación de este género necesita medios de cultivo selectivos de uso poco común y tiempos de cultivo prolongados, lo que dificulta los estudios de este tipo. Por otra parte, en los laboratorios microbiológicos hospitalarios, la identificación de *Scedosporium* spp., suele realizarse únicamente mediante observación morfológica convencional, técnicas insuficientes para definir una identificación a nivel de especie. Además, en nuestro país, la derivación de estos aislados se rige por la necesidad del laboratorio de origen, lo que representa un sesgo de muestreo en el presente trabajo.

En particular, es difícil definir como caso autóctono el correspondiente al aislado DMic 175588, dado el viaje a Europa que realiza el paciente previo a adquirir la colonización (70). Sin embargo, en el caso del aislado DMic 175378, sabemos que el paciente nunca salió del país, por lo que este sí está confirmado como el primer aislado autóctono de *S. aurantiacum* en Argentina.

A pesar del sesgo de muestreo comentado anteriormente, en este estudio se incluyen aislados derivados durante más de 30 años, a lo largo de los cuales *S. boydii*, *S.*

apiospermum y *S. angustum* se encuentran representados. Sin embargo, resulta llamativo que los dos aislados de *S. aurantiacum* fueron recuperados entre 2016 y 2017, por lo que permanece sin resolver si esta especie es un patógeno emergente, o siempre estuvo circulando en el país sin ser detectada.

Resulta particularmente importante la identificación de *S. aurantiacum* a nivel de especie, dado que los aislados recuperados en Australia y Europa presentan perfiles de CIM altas para todos las drogas antifúngicas, exceptuando al VZ. Ambos aislados de Argentina tratados en este estudio, muestran el mismo comportamiento. Esta especie puede identificarse en forma presuntiva por la liberación de pigmento amarillo en PDA y por la presencia de tonos amarillos a naranjas en el reverso de la colonia. A pesar de que esta característica puede ser una herramienta de gran utilidad para los laboratorios de microbiología clínica, la identificación confirmatoria debe realizarse por secuenciación de alguno de los marcadores moleculares utilizados en este estudio.

El clado C es una especie filogenética claramente separada del resto de las especies de *Scedosporium* y que proponemos como nueva, *Scedosporium clavisporum*. Está representada por el aislado DMic 165285 de micosis subcutánea de mano, aislado en el año 2016 en la provincia de Salta, Argentina y por CBS 218.35 aislado de micetoma de pie, descrita en 1929 y originario de Paraguay. Las secuencias de ambos aislados tienen una similitud del 100% en el gen *BT2* y 99,8% en las de ITS (sólo una base de diferencia). Esta especie integra un clado monofilético con un soporte de bootstrap del 100% y los estimadores de distancia evolutiva que se muestran en la figura 9, evidencian una mayor cercanía con resto de las especies de *Scedosporium* que con especies de otros géneros relacionados, pertenecientes a Microascaceae.

Las características culturales mostraron algunas similitudes y algunas diferencias, estas últimas están dadas principalmente por la poca producción de conidios desde células

conidiógenas diferenciadas de CBS 218.35 y la fragmentación tálica del micelio vegetativo y en hifas fértiles.

La cepa CBS 218.35 ha sido conservada hace 88 años, pensamos que las características fenotípicas de la misma se han ido degenerando con el paso del tiempo, si bien se hace referencia a un anamorfo de *P. boydii*, nunca han sido descritos claramente sus caracteres. En su primer descripción *Indiella americana* Delemare Gatti 1929 (71), solo se describen estructuras del hongo constitutivas del grano y del tejido infectado. En el año 1931 Vuillemin, en un tratado llamado "Madurellées", tiene el mismo enfoque en el abordaje, pero se incluyen algunas observaciones del hongo en cultivo, el autor concluye: "*Madurella americana* Vuill. (*Indiella americana* Delemare Gatti 1929) no es otra que *Aleurisma apiosperma*", basándose en descripciones de Saccardo (72). Luego en el Atlas of Clinical Fungi del año 2000, aparecen estos nombres como sinónimos de *P. boydii* (2). En 2005 Gilgado y cols. la incluyen como *I. americana* en un estudio integral sobre el género *Pseudallescheria*, la confirman como anamorfo de esta especie y demuestran que es una especie filogenéticamente distante del resto (12). Finalmente en 2012 de Hoog y cols. confirman que el género *Indiella* fue descartado y que CBS 218.35 es un sinónimo de *P. boydii* (21). Teniendo en cuenta que desde hace tiempo CBS 218.35 está vinculada con *Scedosporium*, siendo la única cepa que integraba un clado separado del resto y nunca hubo una descripción del hongo en cultivo, probablemente tenga que ver con la escasa expresión de estructuras reproductivas que no permitieron una clara descripción. Aun así CBS 218.35 y DMic 165285 comparten un conjunto de características importantes, incluyendo caracteres fisiológicos, morfológicos y moleculares, con las que es posible diferenciarlas de las demás especies del género.

DMic 165285 es genéticamente idéntico a CBS 218.35, pero expresa activamente estructuras de reproducción y abundante esporulación, por eso es que se propone que, en base a la descripción, se constituya como cepa tipo de *Scedosporium clavisporum*.

En el estudio de sensibilidad *in vitro* de los aislados DMic, no fue posible asignar categorías de sensible/ intermedio/ resistente, dado que no existen puntos de corte clínicos ni epidemiológicos para el género *Scedosporium*. Sin embargo, observamos variación inter e intra especie, confirmando lo observado por otros autores en relación a la sensibilidad frente a los antifúngicos. Los valores de CIM que presentaron los aislados autóctonos de *S. angustum*, *S. boydii* y *S. apiospermum* son similares a los comunicados en otras series a nivel internacional, presentando una distribución no uniforme de los valores de la CIM, a excepción del voriconazol, y difiriendo únicamente con el itraconazol, ya que se registró una CIM₅₀ menor en las tres especies evaluadas (18,44,46,62,66,73–75). En un trabajo de Australia, en el que se evaluaron 14 *S. apiospermum* el itraconazol registró un valor de CIM₅₀ similar al registrado en nuestros aislados (75). Este es el primer trabajo en donde se documenta los valores de la CIM *in vitro* de *S. clavissporum* sp. nov. y *S. aurantiacum* aislados en Argentina.

Debido a las diferencias intraespecíficas o el escaso número de aislados no se pudo determinar el perfil único de sensibilidad para cada especie. La distribución de los valores de CIM no fue uniforme, por lo que es necesario la determinación *in vitro* de cada aislado.

Conclusiones

1. En este trabajo se demostró que la diversidad de especies del género *Scedosporium* en aislados clínicos en Argentina es variada dentro del “Complejo de especies *S. apiospermum*” y que se distribuyen principalmente en *S. boydii*, *S. apiospermum* y *S. angustum*.
2. Se identificaron 2 aislados de *S. aurantiacum* provenientes de paciente con FQ, especie no reportada en nuestro país ni en América. Uno de ellos, se confirmó como el primer caso clínico autóctono americano por *S. aurantiacum*, ya que el paciente nunca abandonó el país.
3. Se detectó el primer hallazgo de mutación en la conidiogénesis tipo “*Polycytella*” en un aislado de *S. aurantiacum*, que hasta ahora sólo había sido reportada para *S. apiospermum*.
4. Se describe una nueva especie *S. clavisorum* que genéticamente es idéntica a “*Indiella americana*” (Delemare Gatti 1929), descrita hace 88 años, ambas de Sudamérica y aisladas de micosis subcutáneas.
5. Este es el primer trabajo en donde se documenta los valores de la CIM de *S. clavisorum* sp. nov. y *S. aurantiacum* aislados en Argentina.
6. En general, el VZ resultó ser el antifúngico más activo, con valores de CIM menores o iguales a 2 mg/l en a 40 de 43 aislados.
7. En este estudio se demuestra que los perfiles de CIM para todos los aislados clínicos DMic de Argentina, tienen un comportamiento similar que los descritos a nivel mundial, por lo que es necesario la determinación *in vitro* de cada aislado.
8. Este trabajo resalta la importancia de realizar estudios multicéntricos y estudios ambientales para comprender con precisión la epidemiología de las especies de este género a nivel nacional o regional.

Bibliografía

1. Castellani A. CAJ. Manual of tropical medicine. Baillière T& C, editor. London: Manual of tropical medicine; 1919. 2436 p.
2. de Hoog GS, Guarro J, Gene J FM. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht, The Netherlands.: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000.
3. Shear CL. Life history of an undescribed ascomycete isolated from a granular mycetoma of man. Mycologia. 1922;14:239–43.
4. Negroni P and FI. *Pseudallescheria sheari* n. gen, n. sp. aislada de un paramicetoma de la rodilla. Rev Inst Bacteriol Buenos Aires. 1944;12:195–204.
5. Mc Ginnis MR, Padhye AA AL. *Pseudallescheria* Negroni et Fischer, 1943 and its later synonym *Petriellidium* Malloch, 1970. Mycotaxon. 1970;14:94–102.
6. Dykstra MJ, Salkin IF MM. An ultrastructural comparison of conidiogenesis in *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium inflatum* and *Scopulariopsis brumptii*. Mycologia. 1989;81:896–904.
7. Von Arx JA. The genera *Petriellidium* and *Pithoascus* (Microascaceae). Persoonia. 1973;7(3):367–75.
8. Issakainen J, Jalava J, Saari J, Campbell CK. Relationship of *Scedosporium prolificans* with *Petriella* confirmed by partial LSU rDNA sequences. Mycol Res. 1999;103(9):1179–84.
9. J. ISSAKAINEN, J. JALAVA t EE t & CKC. Relatedness of *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and *Graphium* pro parte based on SSU rDNA sequences. J Med Vet Mycol. 1997;(September):389–98.
10. Hawksworth DL. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. IMA Fungus. 2011;2(2):155–62.
11. Lackner M, de Hoog GS, Yang L, Ferreira Moreno L, Ahmed SA, Andreas F, et al. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. Fungal Divers. 2014;67(1):1–10.
12. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J, Gene J. Molecular Phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* Species Complex : Proposal of Two New Species Molecular Phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* Species Complex : Proposal of Two New Species †. J Clin Microbiol. 2005;43(10):4930–42.
13. Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. J Clin Microbiol. 2008;46(2):766–71.
14. Gilgado F, Gené J, Cano J, Guarro J. Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. Med Mycol. 2010;48:122–8.
15. Crous PW, Wingfield MJ, Burgess TI, Hardy GESJ, Crane C, Barrett S, et al. Fungal Planet description sheets : 469 – 557. Persoonia. 2016;37(2016):218–403.

16. Chen M, Zeng J, De Hoog GS, Stielow B, Gerrits Van Den Ende AHG, Liao W, et al. The “species complex” issue in clinically relevant fungi: A case study in *Scedosporium apiospermum*. *Fungal Biol.* 2015;(May 2016):1–10.
17. Rainer J, De Hoog GS, Wedde M, Graser Y, Gilges S. Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3267–73.
18. Lackner M, De Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, et al. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2635–42.
19. E. B. Les mycetomes. *Arch Parasitol.* 1919;
20. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, et al. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):157–97.
21. De Hoog GS, Van Diepeningen AD, Mahgoub ES, Van De Sande WWJ. New species of *Madurella*, causative agents of black-grain mycetoma. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):988–94.
22. Barbadilla FG. Caracterización molecular y fenotípica del género *Pseudallescheria* y géneros afines. 2007. 236 p.
23. Rainer J, De Hoog GS. Molecular taxonomy and ecology of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium prolificans* (Microascaceae) containing opportunistic agents on humans. *Mycol Res.* 2006;110(2):151–60.
24. Guarro J, Kantarcioglu a S, Horr e R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol.* 2006;44(4):295–327.
25. Kaltseis J, Rainer J, DeHoog GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol.* 2009;47(4):398–405.
26. Wellman AM, Zajic JE. Hyphomycetes utilizing natural gas1. 1973;
27. Garc a-Pe a EI, Hern andez S, Favela-Torres E, Auria R, Revah S. Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnol Bioeng.* 2001;76(1):61–9.
28. Potin O, Rafin C, Veignie E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2004;54(1):45–52.
29. de Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Gu ho E. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*  kologie und Physiologie der opportunistischen Pilze *Pseudallescheria boydii* und *Scedosporium prolificans*. *Mycoses.* 1994;37(3–4):71–8.
30. Harun A, Gilgado F, Chen SC, Meyer W. Abundance of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways

in cystic fibrosis. *Med Mycol.* 2010;48 Suppl 1:S70–6.

31. Rougeron A, Schuliar G, Leto J, Sitterl?? E, Landry D, Bougnoux ME, et al. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* species complex. *Environ Microbiol.* 2015;
32. Negroni R, López Daneri G, Arechavala A, Bianchi MH, Robles AM. Estudio clínico y microbiológico de los micetomas observados en el Hospital de Infecciosas Francisco J. Muñiz en el período 1989-2004. *Rev Argent Microbiol.* 2006;38(1):13–8.
33. van de Sande WWJ. Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(11).
34. Kaur J, Duan SY, Vaas LAI, Penesyan A, Meyer W, Paulsen IT, et al. Phenotypic profiling of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic pathogen colonizing human lungs. *PLoS One.* 2015;10(3):1–14.
35. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen S. Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol.* 2010;48:S37–44.
36. Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 2008;
37. Horr  R, Marklein G. Isolation and clinical significance of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species. *Med Mycol.* 2009;47(4):415–21.
38. Pham T, Giraud S, Schuliar G, Rougeron A, Bouchara JP. Scedo-Select III: A new semi-selective culture medium for detection of the *Scedosporium apiospermum* species complex. *Med Mycol.* 2015;
39. Lau A, Chen S, Sleiman S, Sorrell T. Current status and future perspectives on molecular and serological methods in diagnostic mycology. *Future Microbiol.* 2009;4(9):1185–222.
40. Ramsperger M, Duan S, Sorrell TC, Meyer W, Chen SC -a. The Genus *Scedosporium* and *Pseudallescheria*: Current Challenges in Laboratory Diagnosis. *Curr Clin Microbiol Reports.* 2014;1(1–2):27–36.
41. Lu Q, Gerrits Van Den Ende AHG, Bakkers JMJE, Sun J, Lackner M, Najafzadeh MJ, et al. Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species by three molecular methods. *J Clin Microbiol.* 2011;
42. Troke P, Aguirrebengoa K, Arteaga C, Ellis D, Heath CH, Lutsar I, et al. Treatment of scedosporiosis with voriconazole: Clinical experience with 107 patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1743–50.
43. Rodriguez-Tudela JL, Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, et al. Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. *Med Mycol.* 2009;47(4):359–70.
44. Lackner M, Rezusta A, Villuendas MC, Palacian MP, Meis JF, Klaassen CH. Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An in vitro antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. *Mycoses.*

2011;54(SUPPL. 3):12–21.

45. Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol*. 2009;47(4):371–4.
46. Lackner M, Hagen F, Meis JF, Van Den Ende AHGG, Vu D, Robert V, et al. Susceptibility and diversity in the therapy-refractory genus *scedosporium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(10):5877–85.
47. Grenouillet F, Botterel F, Crouzet J, Larosa F, Hicheri Y, Forel J-M, et al. *Scedosporium prolificans*: an emerging pathogen in France? *Med Mycol*. 2009;47(4):343–50.
48. Schwarz C, Brandt C, Antweiler E, Krannich A, Staab D, Schmitt-Grohé S, et al. Prospective multicenter German study on pulmonary colonization with *Scedosporium* /*Lomentospora* species in cystic fibrosis: Epidemiology and new association factors. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171485.
49. Subedi S, Chen SCA. Epidemiology of *Scedosporiosis*. *Curr Fungal Infect Rep*. 2015;9(4):275–84.
50. Wakabayashi Y, Okugawa S, Tatsuno K, Ikeda M, Misawa Y, Koyano S, et al. *Scedosporium prolificans* Endocarditis: Case Report and Literature Review. *Intern Med*. 2016;55(1):79–82.
51. Oliveira JSR, Kerbauy FR, Colombo a L, Bahia DMM, Pinheiro GS, Silva MRR, et al. Fungal infections in marrow transplant recipients under antifungal prophylaxis with fluconazole. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(7):789–98.
52. Díaz MC, Juliet C. Absceso de herida operatoria por *Scedosporium prolificans*: Primer aislamiento en Chile. Revisión de la literatura. *Rev Chil Infectología*. 2004;21(1):65–9.
53. Lizaso D, Aguilera K, Yantorno L, Cuitiño M, Pérez L, Roccia Rossi I, et al. Infección Fúngica oportunista en un trabajador rural viviendo con VIH/sida Opportunistic fungal infection in a rural worker infected with HIV. *Actual SIDA*. 2009;17(63):18–23.
54. Delhaes L, Harun A, Chen SCA, Nguyen Q, Slavin M, Heath CH, et al. Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(2):282–90.
55. Heath CH, Slavin MA, Sorrell TC, Handke R, Harun A, Phillips M, et al. Population-based surveillance for *scedosporiosis* in Australia: Epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(7):689–93.
56. Nakamura Y, Suzuki N, Nakajima Y, Utsumi Y. *Scedosporium aurantiacum* brain abscess after near-drowning in a survivor of a tsunami in Japan. *Respir Investig*. 2013;51(4):207–11.
57. Nylander JAA. MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evol Biol Cent Uppsala Univ*. 2004;2(October):1–2.
58. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725–9.

59. Clsi. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi ; Approved Standard — Second Edition. Vol. 28, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. 1-35 p.
60. Testing S. M59 Epidemiological Cutoff Values for Antifungal. 2016;
61. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Johnson E, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and aspergillus spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5150–4.
62. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3380–7.
63. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(S3):27–46.
64. A. Espinel-Ingroff, A. Fothergill, 2 J. Fuller, E. Johnson TP and JT. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Caspofungin and *Aspergillus* spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document)? *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2855–9.
65. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Johnson E, et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the Triazoles and Six *Aspergillus* spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document). *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3251–7.
66. Martin-vicente A, Guarro J, Gonz GM, Lass-flo C, Lackner M, Capilla J. Voriconazole MICs are predictive for the outcome of experimental disseminated scedosporiosis. 2016;1–5.
67. Williamson ECM, Speers D, Arthur IH, Ryan G, Inglis TJJ, Arthur IANH, et al. Molecular Epidemiology of *Scedosporium apiospermum* Infection Determined by PCR Amplification of Ribosomal Intergenic Spacer Sequences in Patients with Chronic Lung Disease. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):47–50.
68. CAMPBELL CK. *Polycytella hominis* gen. et sp. nov., a cause of human pale grain mycetoma. *J Med Vet Mycol.* 1987;(25):301–5.
69. Borman AM, Campbell CK, Linton CJ, Bridge PD, Johnson EM. *Polycytella hominis* is a mutated form of *Scedosporium apiospermum*. *Med Mycol.* 2006;44(1):33–9.
70. Rougeron A, Giraud S, Alastruey-Izquierdo A, Cano-Lira J, Rainer J, Mouhajir A, et al. Ecology of *Scedosporium* Species: Present Knowledge and Future Research. *Mycopathologia.* 2017;
71. Delemare and Gatti. *Indiella americana* Delemare Gatti. *Acad Sci Paris.* 1929;1264.
72. Vuillemin. *Madurella americana* (Delamare & Gatti) Vuill., *Encyclopédie Mycologique.* *Encycl Mycol.* 1931;(2):155.
73. Guinea J, Peláez T, Recio S, Torres-Narbona M, Bouza E. In vitro antifungal activities of isavuconazole (BAL4815), voriconazole, and fluconazole against 1,007

isolates of zygomycete, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1396–400.

74. Wang H, Wan Z, Li R, Lu Q, Yu J. Molecular Identification and Susceptibility of Clinically Relevant *Scedosporium* spp. in China. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
75. Halliday CL, Chen SCA, Kidd SE, van Hal S, Chapman B, Heath CH, et al. Antifungal susceptibilities of non-*Aspergillus* filamentous fungi causing invasive infection in Australia: support for current antifungal guideline recommendations. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2016;48(4):453–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.07.005>

Anexo I. La tabla muestra la presencia de estados a 25°C y desarrollo a distintas temperaturas.

Especies	Numero de cultivo	T	S	39°C	40°C	42°C	45°C
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 85073	-	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 90394	+	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 993530	-	-		+		
<i>Pseudallescheria angusta</i>	DMic 01651	+	-		+		
<i>Pseudallescheria angusta</i>	DMic 031321	+	-		+		
<i>Pseudallescheria angusta</i>	DMic 031333	-	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 062875	+	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 073201	-	-		-		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 083385	+	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 083389	+	-		+		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 083404	-	+		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 093482	-	-		+		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 093510	-	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 103731	+	-		-		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 103737	-	+		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 103813	+	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 103859	+	-		+		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 114031	-	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 114032	+	-		+		
<i>Pseudallescheria angusta</i>	DMic 114102	+	-		+		
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	DMic 134375	-	-		-		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 134638	+	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 165033	+	-		+		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165035	-	-		+		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165036	-	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 165274	+	-		+		
<i>Pseudallescheria angusta</i>	DMic 165275	+	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 165279	+	-		+		
<i>Scedosporium clavissporum</i> sp. nov.	DMic 165285	-	+	+	-		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165286	-	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 165287	-	+		+		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165288	-	+		+		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165290	-	-		+		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 165291	-	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 165341	+	-		+		
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	DMic 175378	-	+		+	+	-
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 175421	-	+		+		
<i>Scedosporium apiospermum</i>	DMic 175525	-	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 175526	+	+		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 175583	+	-		+		
<i>Pseudallescheria angusta</i>	DMic 175584	+	-		+		
<i>Scedosporium boydii</i>	DMic 175585	+	-		+		
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	DMic 175588	-	+		+	+	-
<i>P. boydii</i> (<i>Indiella americana</i>)	CBS 218.35	-	-	+	-		

T: Teleomorfo, S: Sinemas +: desarrollo, -: Ausencia de desarrollo, Celdas en gris: No se realizó la prueba

Anexo II. Secuencias obtenidas en este estudio de CBS 218.35 y DMic 165285 propuestas como nueva especie.

Secuencia parcial del gen β -Tubulina (*BT2*) de la cepa CBS 218.35. (563pb).

```
AGTGACCCTTGGCCCAGTTGTTGCCGGCACC GGACTGGCCGAAAACGAAGTTGTCGGGACGGAAAAGTT
GGCCGAAAGGACCAGCACGGACAGCGTCCATGGTACCGGGCTCGAGATCTACAAGGACGGCGCGAGGA
ACATACTTGTGGCCGAAGCCTAGAATGACGAGTAAAAACGACATGAGTATTGTCCCAGGGCGGAAGC
GGATGACACCATGTCAACCTGTCCGTAGTTTCAACCAGAGACTTACCTCGTTGAAGTAGACGCTCATGCG
CTCAAGCTGGAGTTCAGACGTTCCATTGTAACCTTTGACGTATAAGGGACAATCAGTTTCCGTCGCTGATAA
CCAGGGGTAGCAACAGCACATGTGGCTGGCATTAGGGGAGGGGTGAGGGATTCCCTACACTCCATTGCTA
TCAAGACCGTGCTCGCCAGAAATGGTTTGCCTAAAAACAATAAGTACTCTGTCCATCAAATAAAATATCC
CGAGCAGAATTATTCGCATCCGTTTCTTGGTCGCGCGTCGTCCGGGAAGTGTGCACGCACCAGAAAGCA
GCACC
```

Secuencia parcial del gen β -Tubulina (*BT2*) de la cepa DMic 165285. (563pb).

```
AGTGACCCTTGGCCCAGTTGTTGCCGGCACC GGACTGGCCGAAAACGAAGTTGTCGGGACGGAAAAGTT
GGCCGAAAGGACCAGCACGGACAGCGTCCATGGTACCGGGCTCGAGATCTACAAGGACGGCGCGAGGA
ACATACTTGTGGCCGAAGCCTAGAATGACGAGTAAAAACGACATGAGTATTGTCCCAGGGCGGAAGC
GGATGACACCATGTCAACCTGTCCGTAGTTTCAACCAGAGACTTACCTCGTTGAAGTAGACGCTCATGCG
CTCAAGCTGGAGTTCAGACGTTCCATTGTAACCTTTGACGTATAAGGGACAATCAGTTTCCGTCGCTGATAA
CCAGGGGTAGCAACAGCACATGTGGCTGGCATTAGGGGAGGGGTGAGGGATTCCCTACACTCCATTGCTA
TCAAGACCGTGCTCGCCAGAAATGGTTTGCCTAAAAACAATAAGTACTCTGTCCATCAAATAAAATATCC
CGAGCAGAATTATTCGCATCCGTTTCTTGGTCGCGCGTCGTCCGGGAAGTGTGCACGCACCAGAAAGCA
GCACC
```

Secuencia parcial del gen ITS1- 5.8S -ITS2 del ADNr (ITS) de la cepa DMic 165285. (581pb).

```
CGGGTAACCCTACCTGATCCGAGGTCAAACCATCTTTGAAAAGTTGTGGTTTGACGGCCGGCCTCCGCC
GGGACCCAATGCGAGCTTGCAAAAGAGACTTACTACGCAGAAGGCTCCGCGGGCGGACCGCCACTGTAT
TTCAGGGCCTACGGGGTCGCGAAAAGACTCGCCGTAGCGCCCAACACCGACCCTCCGCTTCGAAAAAA
ACAGAGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGGCAGATTACTGCCGGGCGCAATGTG
CGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGTATTTGTTTTTTTTTTTTTTTCTAATCAGAACATGT
AATCCGCTATAAAAATTGAAGAGTTTGGTGTGCGCGGGGGTTCGTCCCTTTTTTCAGGGGGCGCGGC
CCGCCGCGAGGCAACAGAACATAGGTAAGTTTACAATGGGTTTGGAGTAATAACTCGGTAATGATCCC
TCCGCTGGTTACCAACGGA
```