

El complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* y taxas afines en la rutina del laboratorio micológico clínico

(The *Pseudallescheria/Scedosporium* complex and related taxa in the routine of clinic mycological laboratory)

Eduardo Piontelli L. *

Universidad de Valparaíso, Escuela de Medicina, Cátedra de Micología.
Casilla 92 V, Valparaíso Chile.

*Autor para correspondencia: eduardopiontelli@hotmail.com

Recibido:26-12-12

Aprobado:02-01-13

Palabras Clave: *Pseudallescheria/Scedosporium* complex, taxa relacionados.

Key words: *Pseudallescheria/Scedosporium* complex, related taxa.

RESUMEN

El complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* y taxas relacionados, pertenecientes a un grupo de microhongos con conidios viscosos e integrantes del orden Microascales, se presentan en diversos ambientes comunes asociados a las actividades humanas, ya sea en el suelo como en aguas contaminadas. Actualmente se consideran entre los mayores grupos de hongos filamentosos oportunistas causante de infecciones cutáneas y profundas en el hombre y otros mamíferos. El objetivo principal de este trabajo, consiste en reunir los datos primarios morfofisiológicos más relevantes, útiles para el micólogo médico en el laboratorio, con el aporte adicional de algunos aspectos, biológicos, ecológicos, taxonómicos y moleculares complementarios descritos en la literatura moderna.

INTRODUCCIÓN

El complejo *Pseudallescheria/Scedosporium apiospermum*, integra a un grupo de hongos oportunistas ambientales emergentes y relevantes, causantes de un amplio rango de micosis clínicas superficiales y diseminadas ya sea en pacientes con compromiso inmune y ocasionalmente en inmunocompetentes. Estas infecciones comunes en todo el mundo, tienen un relativo alto grado de virulencia que puede deducirse por su infrecuente ocurrencia de sus especies en el aire, pero su alta prevalencia en los pulmones de pacientes susceptibles, en especial en pacientes con fibrosis quística, así como por presentar un alto nivel de resistencia a los antifúngicos (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008; Lackner *et al.*, 2011a-b). En este último decenio, los integrantes de este complejo y géneros afines se han diversificado como entidades taxonómicas, difiriendo en su ecología y en la habilidad de causar infecciones en humanos y animales, situación que debe ser reconocida y diagnosticada por el micólogo médico (Gilgado *et al.*, 2005-2008-2010; Kaltseis *et al.*, 2009; Eggertsberger *et al.*, 2010). Un limitado número de

ABSTRACT

The *Pseudallescheria/Scedosporium* complex and their related taxa are a group of fungus that conidia are presents in viscous mass and belong to the order Microascales. They are in several common environment related to human activities either in soil as in contaminated water. Nowadays they are considered one of the most opportunistic group of filamentous fungus that may cause superficial and deep skin mycoses infections in man and other mammalian. The aim of this work is to gather the primary relevant morphophysiological aspects, usefull to the medical mycologist in the laboratory, plus the contribution of some of biological, ecological, taxonomical and moleculars complementary aspects that are describe in modern literature.

taxas (generalmente 4 o 5) se presentan comúnmente en los diferentes cuadros clínicos de la literatura internacional, lo que permite en cierta medida, diferenciarlos morfológicamente con la ayuda de algunos datos fisiológicos, una situación de gran ayuda en los hospitales que no poseen en su rutina las técnicas moleculares (Gilgado *et al.*, 2008; Perdomo, 2011). En la actualidad, *Pseudallescheria boydii* se ha subdividido en numerosas especies, varias de las cuales son prácticamente indistinguibles por caracteres fenotípicos en uso. Un factor complicado consiste en los diferentes grados de entrecruzamiento y clonalidad entre las especies, lo que complica que estas entidades genealógicas pueden referirse como a especies en el sentido clásico. Sin embargo, aceptamos en un amplio consenso que *Pseudallescheria* es un complejo de especies y no una única especie (Perdomo, 2011; de Hoog *et al.*, 2011).

Debido a lo disperso de la información científica relacionada con este complejo, el objetivo principal de esta presentación, es reunir los datos fenéticos más relevantes útiles para el micólogo en el laboratorio, con el aporte adicional de algunos aspectos, biológicos,

ecológicos, taxonómicos y moleculares complementarios descritos en la literatura moderna.

Aspectos bioecológicos.

El complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* (**Pezizomycotina, Microascales, Microascaceae**), es conocido desde el siglo 19 por sus infecciones poco comunes en humanos, sin embargo, en nuestros días se le considera entre los grupos de oportunistas frecuentes en climas templados y más esporádicos en los trópicos (Cortez *et al.*, 2008). No se conoce claramente su nicho natural, sin embargo, los ambientes donde se ha aislado, presentan una fuerte influencia asociada a la actividad humana (Guarro *et al.*, 2006; Kaltseis *et al.*, 2009a). Se encuentra comúnmente en el suelo (Ajello, 1952; Cortez *et al.*, 2008; Harun *et al.*, 2009a), en especial en suelos enriquecidos o contaminados, tales como suelos agrícolas o de jardines (Bakerspigel & Schaus, 1984), alcantarillas (Cooke & Kahler, 1955), cunetas con barro, ambientes osmóticos, como aguas marinas de estuarios, suelos marinos y madera sumergida en estuarios, así como en diferentes tipos de guano (Kirk, 1967; Dabrowa *et al.*, 1964), como también en suelos con hidrocarburos donde pueden asimilar gas naturales y compuestos aromáticos, pudiendo usarse como agentes de bioremediación (Clausen & Schmidt, 1999). Todos estos ambientes pobremente aireados, permiten que el hongo pueda crecer a baja tensión de oxígeno o en condiciones anaeróbicas y tolerar in vitro 5% de cloruro de sodio (De Hoog *et al.*, 1994).

El traslado de los integrantes de este complejo desde un hábitat particular determinado (rurales u otros) a otros diferentes nichos ecológicos naturales poco conocidos, incluyendo los nuevos ambientes dominados por el hombre, puede permitir una selección de genotipos virulentos (cepas clínicas *versus* ambientales). Esto ofrece una amplia oportunidad para las especies, aumentando muchas de ellas su virulencia sin poner en riesgo su propia existencia. Mientras más rápido crecen los genotipos resistentes, muchas cepas tienen más capacidad de transmisión y selección, quizás en un corto camino evolutivo (De Hoog, 2012).

A pesar de su ocurrencia en los suelos y aguas en climas templados, el complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* es consistentemente termotolerante (37-42°C) con la habilidad de sobrevivencia a muy bajas presiones de oxígeno (Dabrowa *et al.*, 1964; Kaltseis *et al.*, 2009; Eggertsberger, *et al.*, 2010). Esto podría indicar un nicho ecológico asociado a los animales de sangre caliente como vectores de diseminación (<http://www.scedosporium-ecmm.com/DefaultInfo.aspx?Page=Home.....> 2010).

Importancia clínica.

Los cuadros clínicos más diversos encontrados en la literatura son comunes en todo el orbe, ya sea

en pacientes con compromiso inmune como en inmunocompetentes: micetoma, artritis, osteomielitis, endoftalmítis u otras infecciones oculares, onicomycosis, sinusitis, otitis, bolas fúngicas pulmonares, broncopatías alérgicas, cuadros graves con infecciones pulmonares invasivas, endocarditis, infecciones del sistema nervioso central, entre otras (Guarro *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 2006; Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008; Rodríguez-Tudela, *et al.* (2009). Cortez *et al.*, 2008; Harun *et al.*, 2009b; Gelabert-González *et al.*, 2010). Muchos de estos cuadros clínicos derivan en micosis sistémicas, con altas tasas de mortalidad debido a la elevada virulencia y a la resistencia a los tratamientos antifúngicos convencionales que presenta este grupo de hongos, en especial *S. prolificans* (Alastruey-Izquierdo, *et al.*, 2007; Cortez *et al.*, 2008; Rodríguez-Trudela *et al.*, 2009; Lackner *et al.*, 2011). En Chile, se han descrito diversos casos de scedosporiosis, principalmente del complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* y *S. prolificans* (Oddo, *et al.*, 1985; Díaz *et al.*, 2004; Briones *et al.*, 2006; Chanqueo *et al.*, 2009, entre otros). Debe destacarse el reciente aislamiento de *Pseudallescheria boydii sensu stricto*, en un paciente con cuadro sinusal (Nota del autor).

Las especies clínicamente más relevantes son: *Pseudallescheria boydii* con su anamorfo *Scedosporium boydii*, *Scedosporium apiospermum*, anamorfo de *Pseudallescheria apiosperma*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium prolificans* y *Scedosporium de hoogii*, mientras *Pseudallescheria minutispora*, *Petriellopsis desertorum* y algunos integrantes del género *Petriella* son agentes excepcionales en micosis humanas o animales (Issakainen *et al.* 1997, 1999, de Hoog *et al.* 2000, Okada *et al.* 2000; Gilgado *et al.*, 2005- 2008- 2010; Cortez *et al.*, 2008).

Aspectos Taxonómicos.

El género ha experimentado diversos cambios en su nomenclatura en el tiempo. Saccardo, en 1911, aisló de un paciente con micetoma un hongo al cual denominó *Monosporium apiospermum*, posteriormente el mismo autor lo denominó *Scedosporium*, sin proponer formalmente el género. En 1919, Castellani y Chalmers validan el nombre *Scedosporium* con la nueva combinación, *S. apiospermum*. En 1922, Shear describe un nuevo ascomycete, *Allescheria boydii*, aislado de un micetoma y Emmons (1944), sugirió que *S. apiospermum* era el anamorfo de *A. boydii*. En 1970, Malloch reclasificó el teleomorfo como *Petriellidium boydii*, y más tarde este género fue considerado sinónimo de *Pseudallescheria*. Hughes (1958), acepta *S. apiospermum* como nombre correcto para el anamorfo de *P. boydii*.

Malloch y Salkin (1984), describieron la nueva especie *Scedosporium inflatum*, aislada de médula

ósea en un niño inmunocompetente y Gueho y De Hoog (1991), mediante reasociación ADN/ADN, demostraron que *Lomentospora prolificans* tenía 100% de identidad con *S. inflatum* y propusieron la nueva combinación *S. prolificans*. Más recientemente, a partir de datos genéticos y morfológicos, Gilgado *et al.* (2005, 2008, 2010) propusieron nuevas especies (*S. aurantiacum*, *S. boydii* y *S. dehoogii*, esta última incluye la nueva especie *S. deficiens* (Rainer & Kaltseis 2010), lo que indica la heterogeneidad de sus integrantes.

Aspectos fenéticos y filogenéticos útiles en el diagnóstico

Los integrantes del género polimórfico *Scedosporium* y sus relativos, incluyen anamorfos con conidios húmedos. *Graphium* y *Parascedosporium* también pertenecen a este complejo, mientras los teleomorfos se encuentran en *Pseudallescheria*, *Petriella*, *Petrellopsis* y *Lophotricus* (von Arx y col., 1988; de Hoog y col., 2000; Gilgado *et al.*, 2005, 2007, 2009; Lackner & de Hoog, 2011).

La biología molecular subdivide en varios clados fisiológicos, genéticos y ecológicos a este grupo de hongos (Lakner *et al.*, 2010; Lackner & de Hoog, 2011). El clado oportunista *Pseudallescheria*, se caracteriza por la producción de cuerpos fructíferos cerrados (cleistotecios), esféricos (Fig. 1), con paredes finas, membranáceas y de textura "epidermoidea" (Shear, 1922). Los ascos suelen ser esféricos, de paredes delgadas, evanescentes y contienen gene-

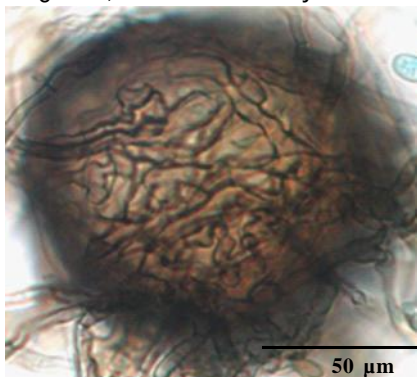


Figura 1- Cleistotecio de *Pseudallescheria boydii* con sus paredes de textura epidermoidea

almente ocho ascosporas usualmente simétricas, elipsoidales o fusiformes. Incluye las siguientes especies: *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium dehoogii*, *Pseudallescheria minutispora*, *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria apiosperma*, *Pseudallescheria desertorum* (= *Petrelidium desertorum*); esta última es otra especie estrechamente relacionada (Lu *et al.*, 2011). *Scedosporium* (Fig. 2A-B) se caracteriza por presentar conidioforos usualmente no ramificados, con células conidiógenas anelídicas. Las células conidiógenas

o anélides pueden presentarse también en forma sésil sobre hifas indiferenciadas, con conidios de forma obovoidal y de color marrón. (Dykstra *et al.*, 1989).

Scedosporium prolificans, integra un clado separado, sin teleomorfo conocido, sin embargo, es también oportunista en el hombre y representa el más cercano relativo a *Parascedosporium putredinis*

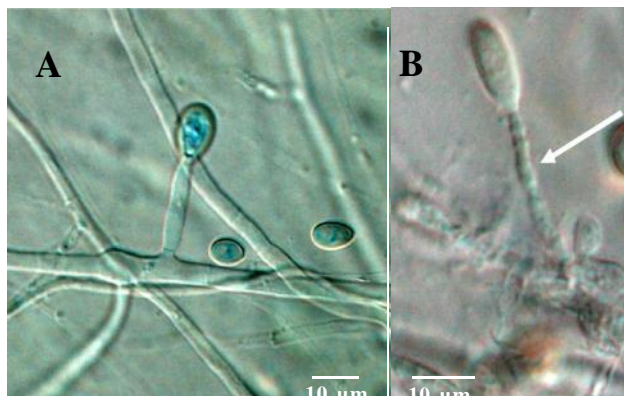


Figura 2. A. Célula conidiógena joven de *Scedosporium apiospermum*, B. Detalle de anélide en célula conidiógena madura (flecha)

como clado hermano. En contraste con *S. prolificans*, *P. putredinis* fue reportado solo 1 vez en una infección humana por Vuillemin en 1910, como *Rhinocladium lesnei*. Sin embargo, se ha dudado de la credibilidad de este caso y no se ha encontrado nuevamente en infecciones humanas (Lackner & de Hoog, 2011).

Petriella sordida, *Petriella guttulata*, *Petriella setifera* y *Petrellopsis africana*, forman un clado separado asociado al suelo y los excrementos y aparentemente no se han detectado en infecciones humanas.

Gilgado *et al.* (2007) introducen el género polimórfico *Parascedosporium* en su revisión de *Scedosporium*; su descripción fue basada en una cepa auténtica de *Graphium tectonae* (Booth 1964), CBS 127.84, que renombraron *Parascedosporium tectonae*, aislado de semillas de *Tectonia grandis* en Jamaica.

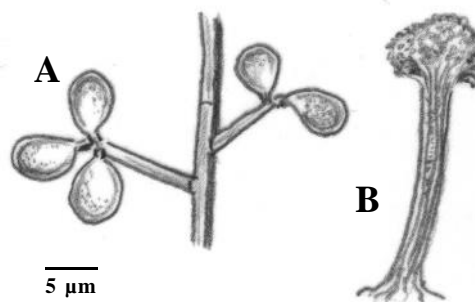


Figura 3. A. *Parascedosporium putredinis*. Conidios semejantes a *scedosporium* que nacen lateralmente sobre dentículos. B. Estado de *Graphium*

Scedosporium, consistentemente presenta una conidiogénesis percurrente, mientras **Parascedosporium** presenta una conidiogénesis simpodial con conidios semejantes a scedosporium. Lackner & de Hoog (2011), investigaron las características morfológicas de varias cepas de *G. putredinis* y una cepa de *Parascedosporium tectonae*, observando que todos los aislados presentan las características de conidióforos solitarios semejantes a scedosporium, que originan células conidiógenas laterales cilíndricas con 2-5 denticulos cilíndricos, incluso algunas cepas forman sinemata adicional con conidiogénesis anelídica. Debido a esto concluyen que la nomenclatura de este grupo de especies debe modificarse en una nueva combinación como *Parascedosporium putredinis* (Vea lista de sinónimos en el trabajo de estos autores). No hay evidencias que el clado *P. putredinis*, puede ser virulento en los humanos, y al parecer no exhibe ninguna especialización ecológica, debido a que sus cepas se han aislado desde material vegetal vivo, suelo, excrementos y detritus vegetales, su temperatura máxima de crecimiento es de 37°C. (Lackner & de Hoog 2011).

Graphium se caracteriza por presentar conidióforos ramificados, especialmente en el ápice de su sinema de color aceituna-marrón (Fig. 4), que termina en un conjunto apretado de células conidiógenas (anélides) delgadas en cuyo ápice se acumulan los conidios en una masa mucoide. Su conidiogénesis es similar a la de *Scedosporium*, pero sus células conidiógenas son más pequeñas y los conidios más estrechos y menos pigmentados (de Hoog *et al.*, 2000). Este sinanamorfo no siempre está presente en los cultivos (Vea Tabla 1).

La familia **Microascaceae** incluye otros géneros que son morfológicamente similares a *Pseudallescheria* (von Arx y col., 1988). Entre los que también presentan anamorfos en *Scedosporium* y *Graphium*, como el género *Petriella* Curzi (Fig. 5. A-B),

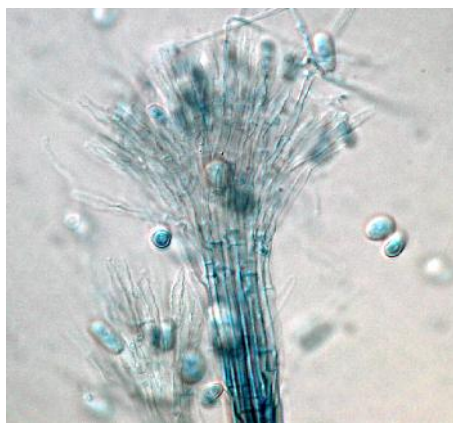


Figura 4. *Graphium* sp. sinanamorfo del complejo *Pseudallescheria/Scedoaporium*

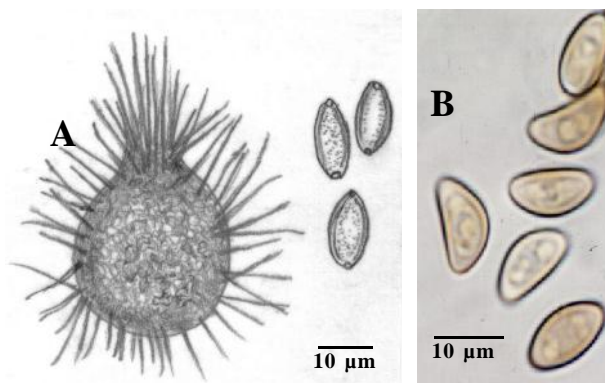


Figura 5. A. *Petriella setifera*. Peritecio y ascoporas, B. Ascoporas de *Petriella guttulata* (Tomado de: website.nbm-mnb.ca)

que se distingue principalmente por presentar ascomas ostiolados (peritecios). Von Arx (1973), sugirió que la presencia o ausencia de aberturas en los peritecios podría estar influenciada por las condiciones culturales, situación demostrada posteriormente por Issakainen *et al.*, (1997, 1999) y Rainer y de Hoog, (2006) a partir de sus estudios moleculares basados en los genes 18S y 28S del ADN ribosómico (ADNr). Dichos estudios determinaron que *Petriella* y *Pseudallescheria* son géneros genéticamente bien diferenciados.

Aunque son varias las especies de *Scedosporium* de importancia clínica, sólo las más comunes (4-5) permiten su descripción con aportes morfofisiológicos útiles en la rutina primaria del laboratorio micológico (Gilgado *et al.*, 2008).

Conocemos que el complejo *Pseudallescheria* concentra el mayor número de cepas clínicas en la literatura e incluye patógenos ambientales con anamorfos en *Scedosporium* y *Graphium*. Varias especies de *Pseudallescheria* y *Scedosporium*, se consideran organismos indicadores de contaminación en el suelo y las aguas, mientras que la temperatura y la dependencia de ciertas condiciones ambientales aumentan la distribución de estos oportunistas, en especial del complejo *Scedosporium dehoogii*, en suelos enriquecidos con hidrocarburos alifáticos (Ulfig *et al.*, 2008; Kallthesis *et al.*, 2009; Eggertsberger, *et al.*, 2010).

La morfología del conidióforo y de los conidios sésiles y la apariencia de las colonias en PDA son las características más útiles para separar fenotípicamente las diferentes especies en los diferentes clados. Ninguno de los aislados que corresponden a *S. apiospermum* y *S. dehoogii* desarrollan el teleomorfo después de 2 meses, mientras todos ellos desarrollan el anamorfo en *Scedosporium*. Los conidióforos sinematosos (anamorfo en *Graphium*), son usualmente ausentes en *S. dehoogii*, sin embargo, ellos se presentan en un 90% en *S. apiospermum*. *S. dehoogii*, se caracteriza por conidióforos solitarios y usualmente no ramificados, subhialinos a gris pálidos y de paredes finas, conidios

sésiles y colonias gris pálido, mientras los miembros *S. apiospermum* muestran conidióforos ramificados, y conidios sésiles cafésosos de paredes gruesas y colonias cafésosas (Gilgado *et al.*, 2008). El uso de biodisel permite un mejor aislamiento de *S. dehoogii* y *S. deficiens*, mientras *S. aurantiacum* es común en áreas cálidas y áridas (Rodríguez-Trudela, 2009).

Petriella y *Petriellopsis africana*, se aíslan mayoritariamente de excrementos de herbívoros y suelo, salvo excepciones y parece poco probable su oportunismo en vertebrados (Lackner & de Hoog, 2011).

Varios casos clínicos en animales, atribuibles a cepas de *Graphium*, se asocian a cepas posiblemente mal identificadas de *Graphium eumorphum*, debido a que en los casos que se han podido estudiar molecularmente son similares o idénticas a *P. boydii* o *Papiosperma* (Lackner & de Hoog, 2011).

Aquellas especies relacionadas con los **Ophiostomatales** con una morfología aparente de *Graphium*, residen en *Pesotum*. En contraste, *Graphium* fue redefinido para incluir todas las especies sinematosas en las **Microascales**, incluyendo las pertenecientes a los complejos *G. penicillioides* y *G. putredinis* (Okada *et al.* 1998, 2000). Los agregados en *G. putredinis* son filogenéticamente relacionados con las especies de *Parascedosporium*, *Petriella*, *Pseudallescheria* y *Scedosporium* que son oportunista en humanos (Issakainen *et al.* 1999, de Hoog *et al.* 2000, Okada *et al.* 2000, Gilgado *et al.* 2007).

Las especies de *Graphium*, muestran estrecha asociación con los escarabajos de la corteza, salvo un caso clínico de *G. basitruncatum* en una leucemia (Kunart *et al.* 2007), mientras *Parascedosporium putredinis* (= *Graphium putredinis*), parece no exhibir ninguna especialización ecológica (Lackner & de Hoog (2011)).

Es esencial en laboratorio micológico clínico la recuperación de los datos más recientes en la literatura, para el entendimiento del complejo *Pseudallescheria/Scedosporium*. En 2002, un grupo amplio de investigadores Europeos se asociaron para compartir estudios sobre este grupo de hongos bajo el paraguas de la European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (www.scedosporiumecmm.com). Una iniciativa similar fue seguida en Australia por The Australian Scedosporium Study Group (AUSCEDO), ambos grupos fueron internacionalizados bajo el auspicio de la International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM). Los objetivos generales de estos grupos de trabajo son los de obtener un mejor conocimiento en la epidemiología y variabilidad genética de estos hongos, como proveer datos de posibles fuentes de contaminación y rutas de infección, así como ofrecer la ayuda necesaria para la identificación molecular de los integrantes de este complejo (De Hoog *et al.*, 2011).

El aporte de las técnicas moleculares

La taxonomía del complejo se ha modificado drásticamente desde la aplicación de la biología molecular, en particular por los artículos de Gilgado *et al.* (2005-2008-2010), una situación que permitió subdividir la clásica especie de *Pseudallescheria boydii* en numerosas especies, varias de las cuales son indistinguibles fenotípicamente con los métodos en uso en la actualidad.

Scedosporium apiospermum fué considerado tradicionalmente el anamorfo de *Pseudallescheria boydii*, sin embargo, recientes estudios moleculares han demostrado que son 2 especies diferentes, debido a que *S. apiospermum* es una especie heterotálica y su teleomorfo es *Pseudallescheria apiosperma* (Gilgado *et al.*, 2008).

Se observa que en los últimos decenios, la literatura presenta una amplia variación de técnicas moleculares para tipificar los aislados del complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* y sus relativos (Issakainen *et al.*, 1997; Gilgado *et al.*, 2005-2008-2010; Harun *et al.*, 2009b; Lackner *et al.*, 2010; Lackner & de Hoog, 2011; Lu *et al.*, 2001), las cuales han permitido discriminar entre las cepas, especificar posibles fuentes de infección, grados de virulencia o determinar la actividad frente a los antifúngicos (San Millan *et al.*, 1997; Gilgado *et al.*, 2006; Guarro *et al.*, 2006; Delhaes *et al.*, 2008).

Los métodos moleculares más discriminatorios para especies de *Scedosporium* son: AFLP, RAPD, PCR y PCR de secuencia entre repeticiones simples (ISSR-PCR) (San Millan *et al.*, 1997; Ruiz-Diez *et al.*, 1997; Solé *et al.*, 2003; Delhaes *et al.*, 2008; Lackner *et al.*, 2011-2012). Dichos análisis han mostrado diversos grados de variación genética, incluso en algunos se han obtenido resultados contradictorios por las influencias de varios factores (diferencias en los métodos y marcadores utilizados, cepas no representativas o el limitado número de aislados estudiados (San Millan *et al.*, 1997; Ruiz-Diez *et al.*, 1997; Solé *et al.*, 2003; Delhaes *et al.*, 2008; Perdomo, 2011). También se ha usado la electroforesis enzimática de multilocus (MLEE) (Zouhair *et al.*, 2001), así como varios genes como la β -tubulina (Gilgado *et al.*, 2005-2008), la calmodulina (Gilgado *et al.*, 2005), la EF1 α (Zeng *et al.*, 2007), los cuales presentan una considerable variabilidad genética. Ultimamente, sumándose a estos métodos se ha empleado un robusto sistema de *multilocus Sequence Typing* (MLST), que provee un buen método de diferenciación de cepas debido a que los métodos fenotípicos convencionales tienen limitado uso para fines epidemiológicos, por ser inadecuadamente discriminatorios (Harun *et al.*, 2009a). Para el grupo de investigadores Lackner *et al.* (2010); Lackner & de Hoog (2011), De Hoog *et al.*, 2011). Las secuencias de ITS, la β -tubulina 2 y los locus TBC de la β -tubulina,

son suficientes para delimitar las especies del complejo *Pseudallescheria/Scedosporium*. Recientemente la espectrometría de masa se está imponiendo como otro método confiable y rápido para la identificación de este complejo, así como de otros hongos y bacterias (Krasny *et al.*, 2011; Sitterle *et al.*, 2012), así como el tipado fisiológico de las cepas mediante el «Taxa Profile MICRONAUT system», un sistema semi automático asistido por computador (Horre *et al.*, 2011).

Diagnóstico de laboratorio

En la mayoría de los casos el hongo se aísla desde cultivos de esputo, de especímenes quirúrgicos o lavado bronquial. *A. fumigatus* también puede encontrarse asociado en el pulmón, una situación frecuente y que puede enmascarar el diagnóstico por su crecimiento más rápido que el complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* y es de utilidad un test de precipitinas que reacciona fuertemente con el primer agente y una débil reacción con *A. versicolor*. A pesar de, la utilidad del cultivo de esputo y el empleo de inmunoprecipitinas en el suero a veces es necesario una muestra por extirpación quirúrgica para el diagnóstico. (Bonduel *et al.*, 2001; Kantarcioglu, *et al.*, 2012)

El cultivo en agar papa dextrosa es el medio más empleado para su determinación morfológica, pero no debemos olvidar que las cepas de *Scedosporium* son de lento crecimiento si se comparan con otros hongos saprófitos oportunistas como los *Aspergillus* (7 a 10 días versus 2 a 4 días, respectivamente), para producir colonias que esporulan. Esto permite considerar el subdiagnóstico de las especies de *Scedosporium* en pacientes con fibrosis quística, donde la colonización de los pulmones es concomitante con *A. fumigatus* (Blyth *et al.*, 2010).

La histopatología muestra hifas con múltiples ramificaciones en ángulo agudo o dicotómicas, también suele observarse la presencia de clamidosporas globosas terminales o intercalares, de hasta 20 µm de diámetro (Fessler & Brown, 1989; Walts, 2001).

Es recomendable depositar el material vivo obtenido en uno de los centros reconocidos de colección para posteriores estudios (ej. CBS).

Medios de cultivo específicos

Rainier *et al.* (2008), desarrollaron un medio semi selectivo para el aislamiento de *P. boydii* y especies relacionadas después de 5-7 días a 36-37°C, que denominaron **Scedosporium selective Agar (SceSel+)**, cuya composición es la siguiente. Extracto de malta, 6.25 g; maltosa, 6.25 g; monofosfato de potasio, 1.25 g; extracto de levadura, 1.0 g; Sulfato de magnesio 7 H₂O, 0.625 g; peptona de soja, 0.625 g; cloramfenicol, 0.1 g (diluido en 5 ml de etanol al 96%); ciprofloxacino, 0.1 g (diluido en 1 ml de NaOH a 1M y agregado al agar a 55°C; Sulfato de estreptomycin, 0.1 g (diluido en 5 ml filtrada en filtro

estéril y agregado al agar a 55°C); dichloran, 2 mg (diluido en 1 ml en una solución al 0,2 de etanol); benomyl, 1,6 mg (diluido en 5 ml de etanol y agregado al agar a 55°C); agar, 20 g; y agregar 983 ml. de agua destilada. Si se emplea este medio sin el benomyl (**SceSel-**), *A. fumigatus* no se inhibe y tiene un crecimiento mayor. En este medio el efecto selectivo de nivel de germinación es alto pudiendo llegar a cifras cercanas al 90%, mientras en los medios no selectivos (PDA, SGA y MEA, los niveles no sobrepasan el 50%.

El aislamiento de fuentes ambientales con el medio SceSel+ es muy exitoso, confirmando que el impacto humano en los suelos favorece la frecuencia del complejo *Pseudallescheria/Scedosporium*. Puede emplearse también el medio agar Rosa de Bengala Cloramfenicol suplementado con benomil a una concentración de 10 µg/ml (Harun *et al.*, 2009a). Debe destacarse que *S. prolificans* difiere de *P. boydii* por su capacidad de crecer en DG18, este medio puede ser usado para su rápida separación cuando no se emplean métodos moleculares (Rainier *et al.*, 2008).

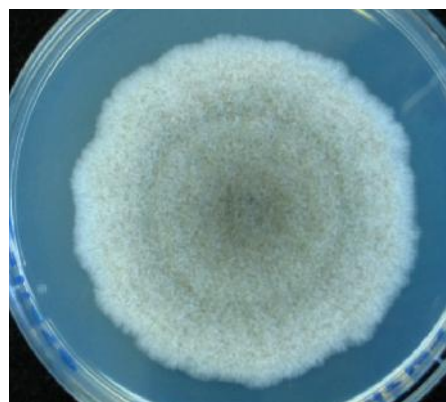


Figura 6. Colonia de *Scedosporium apiospermum*, en PDA, 14 días a 30°C (Dea García Heermoso, CNRMA Institut Pasteur, Scedosporium meeting, Bonn, 2010).

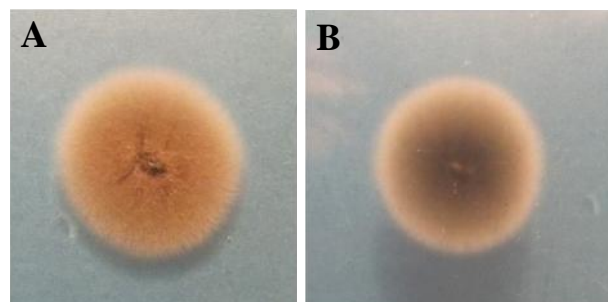


Figura 7. A-B, Colonia de *Scedosporium prolificans* (Anverso y reverso) en PDA durante 7 días a 30 °C.

Descripción morfofisiológica de algunas taxas comunes en cuadros clínicos diversos o aislados desde el ambiente.

1. *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis, A.A., Padhye & Ajello
Anamorfo *Scedosporium boydii* (Shear) Gilgado, Gené, Cano et Guarro.

Colonias flocosas o lanosas de crecimiento relativamente rápido, 30-45 mm en PDA a los 14 días a 25°C. Ascomata cleistotecial (Figura 8 A), inmersos o superficiales, 50-200 µm diám., textura epidermoidea, negros, paráfisis ausentes; ascos evanescentes, unitunicados obovoides a redondos, 12-18 x 9-14 µm. Ascosporas amarillentas a café claro con un poro germinal en ambos extremos, unicelulares, elipsoidales a fusiformes, lisas, 6-9 x 5-6 µm (A). Anamorfo en *Scedosporium* con conidios húmedos sobre células conidiógenas anelídicas (percurrentes), en el micelio aéreo, subhialinos a café, subesféricos a elongados, 6-11 x 3,5-6 µm (B), que se tornan café y de paredes gruesas al liberarse. Otros conidios sésiles nacen desde hifas vegetativas, abundantes, esféricos o subesféricos 5-7 x 5-6 µm (C). A veces presencia de un sinanamorfo en *Graphium* con estipe cilíndrico, liso, conidios en células conidiógenas anelídicas, subhialinos o café pálidos, reunidos en sustancia mucoide, ampliamente clavados 6-12 x 3,5-4 µm. Distribución universal. Referencias Gueho & de Hoog, 1991; De Hoog *et al.*, 2000; Gilgado *et al.*, 2007-2010)

Un pequeño porcentaje de cepas produce espontáneamente ascomas, sin embargo, su formación puede ser estimulada en medios pobres como agar maíz, agar avena o agar papa zanahoria, en 2-3 semanas. *P.boydii* no crece en agar DG18 (baja actividad de agua) y esto permite diferenciarlo de *Scedosporium prolificans* que crece en este medio). El patrón de asimilación de *P. boydii*, *Pangusta*, *P. ellipsoidea* y *P. fusioidea* son similares, sin diferencias significativas. La asimilación de sucrosa, maltosa, D-ribosa, L-arabinol y ribitol, así como el crecimiento a 40 y 45°C permite discriminar entre las especies (Gilgado *et al.*, 2005). Vea Tabla 2.

2. *Pseudallescheria apiosperma* Gilgado, Gené, Cano et Guarro.

Anamorfo *Scedosporium apiospermum* (Sacc.) Castellani & Chalmers

Colonias de crecimiento relativamente rápido, 35-55mm en PDA a los 14 días a 25°C, blancas grisáceas con un reverso gris a negro. Células conidiógenas cilíndricas hialinas que nacen de hifas indiferenciadas únicas o ramificadas, que producen numerosos conidios café pálidos, ampliamente clavados a ovoides, 4-9 x 6-10 µm (Fig. 9 A), redondeados en sus extremos y con base trunca, solitarios, en pequeños grupos o lateralmente directamente en las hifas. El desarrollo conidial se describe como anelídico, una situación difícil de observar al microscopio. En el tiempo, un sinanamorfo en *Graphium* puede observarse frecuentemente en los extremos de las colonias, con conidióforos cilíndricos, café oliva, lisos, que termina en un racimo de células conidiógenas anelídicas delgadas, con conidios subhialinos o café pálidos reunidos en sustancia mucoide, ampliamente clavados, 6-12 x 3,5-4 µm (B). Distribución universal. Temperatura óptima de crecimiento, 30-37°C. Vea Tabla 2.

Los miembros del clado *S.apiospermum*, son morfológicamente indistinguibles del anamorfo de *Pseudallescheria boydii*, y taxas asociados, pero pueden separarse por la respuesta del test de la D-ribosa y por la ausencia de teleomorfo (Tabla2).

Debido a que el teleomorfo no se observa en los aislados de *S. apiospermum*, se aparearon un buen número de aislados en todas las posibles combinaciones. Varias de éstas producen ascomata fértiles típicos del género *Pseudallescheria*, mientras todos los aislados solos fueron autoestériles. Se pudo agrupar los aislados en dos tipos diferentes de cruzamiento: los cruzamientos entre la progenie de ascosporas F1, demostró un sistema de apareamiento bi-alélico heterotálico. Vea Gilgado *et al.*, 2010.

3. *Pseudallescheria minutispora* Gilgado, Gené, Cano & Guarro

Anamorfo *Scedosporium* sp., *Graphium* sp.

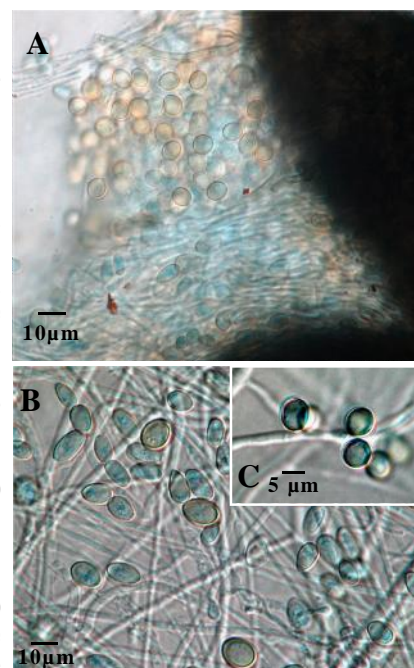


Figura 8. A-B-C, *Pseudallescheria boydii*. A. Cleistotecio con ascosporas, B. Conidios del anamorfo desde células conidiógenas anelídicas, C. conidios sésiles desde hifas vegetativas.

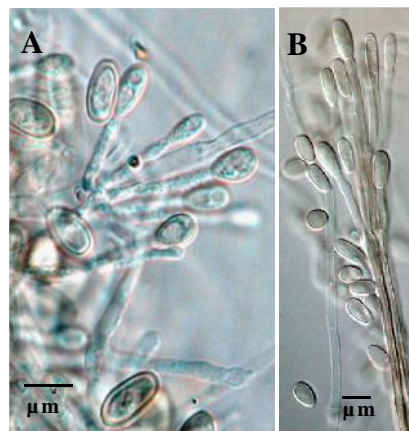


Figura 9. A-B, *Scedosporium apiospermum*, A. Conidios desde células conidiógenas anelídicas, B. *Graphium* sp. sinanamorfo, células conidiógenas conidios y sinema.

Colonias de crecimiento relativamente rápido (50-57 mm a los 14 días en PDA a 25°C, algodonosas a lanosas, gris naranja a combinado con áreas gris café; *ascmata* abundantes en agar avena 50-150 µm diám., (Homotático).perido de textura epidermoidea, gris amarillento a cafésoso-gris, recubierto a veces por hifas café de paredes gruesas. Ascospores (8 esporas) esféricas a subesféricas, 12-15 x 10-13 µm, evanescentes, ascospores unicelulares, con un poro germinal en ambos extremos, elipsoides, 5-7x3-4 µm (A), usualmente con una gota de aceite.

Scedosporium obovoidales, elipsoidales a subclaviformes 6-11 x 3-4 µm (B), lisos, subhialinos sobre conidióforos escasamente ramificados. Conidios de *Graphium*, cilíndricos a claviformes, de base trunca, 5-14 x 2-4,5 µm, sobre *sinnemata* erecto de 180-300 µm de largo. Conidios en hifas vegetativas escasas, elipsoidales o obovoides 7-10 x 3,5-5 µm.usualmente sésiles, subhialinos,lisos de paredes gruesas. Temperatura óptima 25 a 30°C, crecimiento máximo 40°C°, pero puede crecer hasta 42°C. Distribución Bélgica, España.(Gilgado *et al.*, 2005).

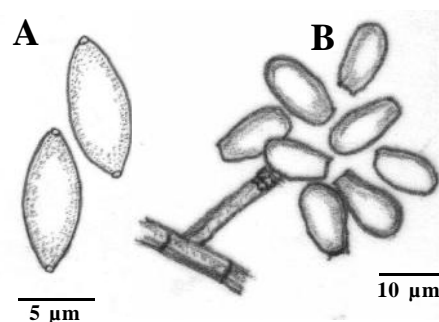


Figura10. A-B *Pseudoallescheria minutispora*, A. Ascosporas con poro germinal en ambos extremos, B. Conidios del anamorfo.

4. *Pseudallescheria fusoidea* (Arx)McGinnis, A.A.Padhya & Ajello (= *Petrelidium fusoideum*).Anamorfo *Scedosporium* sp., *Graphium* sp.

Colonias de crecimiento moderadamente rápido en 14 días en PDA a 25°C, 69-70 mm; grises a café pálido. *Ascomata* 50-160 µm diám. Ascospores abovados a esféricos 12-15 x 10-12 µm. Ascospores ampliamente fusiformes, atenuadas en ambos extremos por poros germinales, 6-7,5 (-9) x 4-4,5 µm (Fig. 11. A). Conidios de *Scedosporium*, 6-7 (-9) x 2,5-4,5 µm (B); conidios en hifas vegetativas abundantes, esféricos a subesféricos, 4-7x4-5µm. Sinanamorfo en *Graphium* raramente presente, con conidios de 4-7 x 4-5 µm.

Filogenéticamente *P. fusoidea* y *P. angusta* son especies muy relacionadas, sin embargo, *P. angusta* muestra *ascmata* pequeños (hasta 110 µm en diám.) y ascospores angostas (3 - 3.5 µm de ancho *versus* 4-4,6 µm en *P. fusoidea*); además las colonias de *P. angusta* son más pequeñas (52 a 54 mm en 14 días en PDA a 25°C).Vea: Von Arx *et al.*, 1988; Gilgado *et al.*, 2005; Guarro *et al.*, 2012.

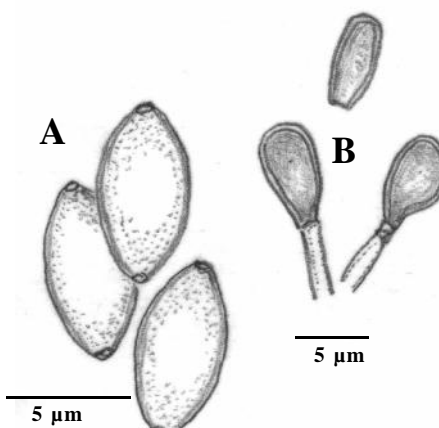


Figura11. A-B.*Pseudoallescheria fusoidea*, A. Ascosporas con poro germinal en ambos extremos, B. Conidios del anamorfo.

5. *Scedosporium aurantiacum* Gilgado, Cano, Gené, et Guarro.

Colonias en PDA , 40 a 50 mm después de 14 días a 25°C, algodonosas o lanosas especialmente en el centro, frecuentemente con anillos con-céntricos de micelio aéreo de diferentes colores, amarillo-gris con áreas grises a cafésosas, reverso café naranja al centro. Todos los aislados producen un pigmento difusible amarillo claro en PDA o agar avena después de unos pocos días de incubación. Conidióforos solitarios en el micelio aéreo o en grupos formando *sinnemata* (*Graphium*) frecuentemente en la superficie del agar. Conidióforos a menudo reducidos a células conidiógenas que crecen lateralmente en un micelio indiferenciado o ramificado, usualmente presentando verticilios de 2-3 células conidiógenas. Se observan 3 tipos de conidios. a) los producidos en conidióforos solitarios, subhialinos, de paredes lisas obovoides o subcilíndrico, 5 -14 x 2 - 5 µm (Fig. 12); (b) Los producidos en *sinnemata*, predominantemente cilíndricos o claviformes, 6 -12 x 3 -5µm con una amplia base trunca,(c) los que se producen en hifas indiferenciadas, sésiles, solitarios, laterales, café, lisos y de paredes gruesas usualmente obovoides, 6 -10 x 3 - 5 µm. Estos últimos se producen abundantemente en todos los aislados. Teleomorfo desconocido. Optima temperatura 37-40°C. Máxima temperatura a 45°C. No crece a 50°C.(Vea Gilgado *et al.*, 2005)

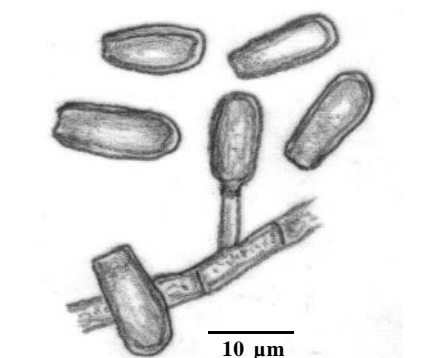


Figura 12. *Scedosporium aurantiacum*. Conidios en conidióforos solitarios.

6. Complejo *Scedosporium dehoogii* Gilgado, Cano, Gené et Guarro, Clado 3 *sensu* Gilgado *et al.* (2008).

Las colonias en PDA alcanzan un diámetro de 45 a 60 mm a 25°C

después de 14 días. Algodonosas, blancas a gris pálido con reverso incoloro; conidióforos solitarios son usualmente reducidos a células conidiógenas, subhialinas, de paredes lisas. usualmente cilíndricas $6-50 \times 1-1,5 \mu\text{m}$, que producen conidios café pálido, obovoides o elipsoidales, $6-11 \times 4-5 \mu\text{m}$. Conidióforos sinematosos erectos, $80-450 \mu\text{m}$ de largo, que terminan en una cabeza mucosa de conidios. Conidios cilíndricos o claviformes, $6-11 \times 3-4 \mu\text{m}$ (Fig. 13 B), de base trunca. Conidios sésiles subhialinos a gris pálido, de paredes delgadas, mayormente abovados, $5-8 \times 5-6 \mu\text{m}$ (A). No se observa teleomorfo en ninguno de los aislados después de 2 meses de cultivo. Máximo crecimiento a 37°C (5 a 10 mm en diám. en 14 días). El hongo puede asimilar ribitol, L-arabinitol, sucrosa y maltosa, pero no D-ribosa (Tabla 2). Gilgado *et al.*, 2008)

Este hongo es común en el ambiente, sin embargo un número reducido de casos se han reportado en la literatura. Algunas cepas de *S. dehoogii* difieren de la especie tipo en las secuencias de ITS. Estas cepas se agrupan en 2 clados en las secuencias de ITS, así como en el gen de la β -tubulina (BT2). Las diferencias se encontraron también en los rangos de crecimiento en agar polivinil alcohol agar suplementado con diesel, aceite de semilla de colza o sin suplemento, en la apariencia de las colonias en los medios que contienen aceite y su crecimiento a 41°C en PDA. En base a esto se propuso una nueva especie *Scedosporium deficiens*. Vea Rainer & Kaltseis (2010).

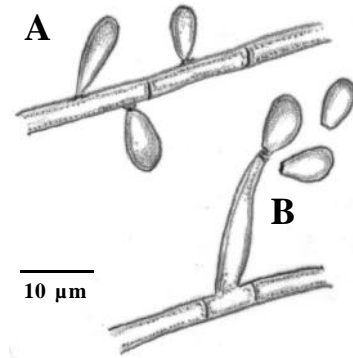


Figura 13. A-B, *Scedosporium dehoogii*. A Conidios sésiles, B. conidios sobre células conidiógenas anelídicas

7. *Scedosporium prolificans* (Hennebert & B.G. Desai) E. Guého & de Hoog (= *Scedosporium inflatum*, = *Lomentospora prolificans*). Teleomorfo desconocido.

Las colonias de *S. prolificans* crecen rápidamente a 25°C y maduran en 5 días en agar Sabouraud. Textura algodonosa y mucoide inicialmente, posteriormente se aplanan con presencia de mechones de micelio finos y cortos. En su anverso las colonias son de un color gris claro a negruzco y se tornan gris negro a negro en la madurez, con el reverso gris a negro (Fig. 7, A-B). Presencia de hifas hialinas septadas y finas donde las células conidiógenas se producen en su extensión. Células conidiógenas en forma de frasco, de base inflada que se adelgazan hacia el ápice formando un largo cuello proliferante (anelídico). Conidios solitarios o en pequeños grupos en el ápice de las anélides, de paredes lisas, hialinos a café pálido, ovoides a piriformes, de base trunca, $2-5 \times 3-13 \mu\text{m}$ (promedio $3,4 \times 5,3 \mu\text{m}$) (Fig. 14 A-B).

Las colonias de *S. prolificans* son oscuras si se comparan con *S. apiospermum* (Fig. 6) La células conidiógenas infladas (anélides) y sus conidios levemente anchos de *S. prolificans*, así como su inhabilidad de asimilar ribitol, xylitol, y L-arabinitol, permiten diferenciar las 2 especies. La diferenciación de ambas especies puede efectuarse también mediante PCR o pruebas de hibridación. (Weddle *et al.*, 1998; De Hoog *et al.*, 2000).

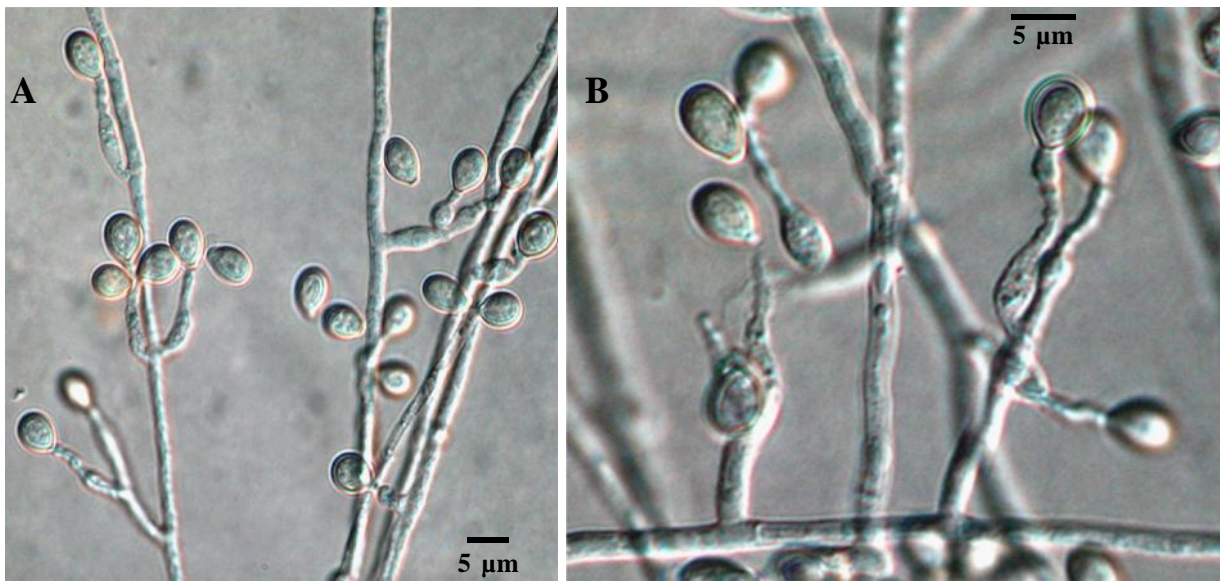


Figura 14. A-B. *Scedosporium prolificans*. Células conidiógenas anelídicas y conidios a diferentes aumentos.

El complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* y taxas afines en la rutina del laboratorio micológico clínico - E.Piontelli.

Tabla 1.- El complejo *Pseudallescheria* y taxa relacionados en las Microascales

(Adaptada de: Lackner *et al.*, www.scedosporium-ecmm.com/.../Lackner2_3rd... 2010 y Lackner & De Hoog, 2011)

Género y Ambiente	Teleomorfo	Anamorfo	Sinanamorfo
<i>Pseudallescheria</i> (Oportunista)	<i>Pseudallescheria boydii</i>	<i>Scedosporium boydii</i>	<i>Graphium sp.</i>
	<i>Pseudallescheria apiosperma</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>Graphium sp.</i>
	<i>Pseudallescheria minutispora</i>	<i>Scedosporium sp.</i>	<i>Graphium sp.</i>
	<i>Pseudallescheria desertorum</i>	<i>Scedosporium sp.</i>	-----
	-----	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	-----
	-----	<i>Scedosporium dehoogii</i>	-----
	-----	<i>Scedosporium deficiens</i>	-----
<i>Parascedosporium</i> (Sin tendencia)	<i>Parascedosporium putredinis*</i>	Semejante a scedosporium	<i>Graphium sp.</i>
<i>Sc. prolificans</i> (Oportunista)	-----	<i>Scedosporium prolificans</i>	-----
<i>Petriellopsis</i> (Suelo y excrementos)	<i>Petriellopsis africana</i>	<i>Scedosporium sp.</i>	<i>Graphium sp.</i>
<i>Petriella</i> (Suelo, excrementos)	<i>Petriella guttulata</i>	<i>Scedosporium sp.</i>	-----
	<i>Petriella setifera</i>	<i>Scedosporium sp.</i>	-----
	<i>Petriella sordida</i>	<i>Scedosporium sp.</i>	-----
	-----	<i>Scedosporium lesnei</i>	<i>Graphium sp</i>
<i>Graphium</i> (Escarabajos de la corteza)	<i>Graphium basitruncatum</i>	-----	-----
	<i>Graphium penicillioides</i>	-----	-----
	<i>Graphium laricis**</i>	-----	-----
	<i>Graphium pseudomicrum**</i>	-----	-----
	<i>Graphium fimbrisporum</i>	-----	-----
<i>Lophotrichus</i>	<i>Lophotrichus fimetii</i>	<i>Scedosporium sp.</i>	-----
<i>Parapetriella</i>	<i>Parapetriella lindforsii</i>	<i>Scedosporium sp.</i>	-----

* (Incluye: *Graphium laricis*, *Graphium putredinis*, *Parascedosporium tectonae*, *Rhinoctadium lesnei*. Lackner & De Hoog, 2011) ** *Graphium laricis* y *G. dormiticum* son morfológicamente y molecularmente casi idénticos, pero con distintos ambientes ecológicos (Okada *et al.*, 1998; Kirschner, 1998)

Tabla 2. Diferenciación morfofisiológica entre especies del complejo *Pseudallescheria/Scedosporium* y *S. prolificans* en PDA a 25°C en 14 días (Gilgado *et al.*, 2008)

Especie	Célula conidiógena	Conidio sésiles	Reverso colonia	Pigmento difusible	Rib.	L-Arab.	Sucr.	Malt.	D-Rib	40°C	45°C
			tono amarillo								
<i>P. boydii</i> y relativos*	Cilíndrica	Glob- subglob. pared gruesa	-	V	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. minutispora</i>	Cilíndrica	Elips-obovoide pared-delgada	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>S. apiospermum</i>	Cilíndrica	Glob-subglob. Pared gruesa	-	V	+	+	+	+	-	+	-
<i>S. aurantiacum</i> complex	Cilíndrica o ligeramente forma de frasco	Obovoide Pared gruesa	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. dehoogii</i>	Cilíndrica o ligeramente forma de frasco	Obovoide pared delgada	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. prolificans</i>	Forma de frasco	Glob-subglob. pared gruesa	-	-	-	-	-	+	-	+	V

Continúa en página siguiente

Abreviaciones y símbolos. * *Pangusta*. *P. ellipsoidea* y *P. fusoidea*. Estas especies pueden clasificarse por medios moleculares o mediante características morfológicas. Abreviaciones Rib. = Ribosa, L.arab. = L-Arabinosa, Sucr. = Sucrosa, Malt. = Maltosa, D. Rib. = D-Ribosa.. El signo V corresponde a variable. El signo (-) respuesta negativa y el signo (+) respuesta positiva.

REFERENCIAS

- Ajello, L.** (1952). The isolation of *Allescheria boydii* Shear, an etiologic agent of mycetomas from soil. J. Trop. Med. 1:27-238
- Alastruey-Izquierdo, A.; Cuenca-Estrella, M. & Monzon, A. et al.,** (2007). Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. Antimicrob. Agents. Chemother. 51:748-51
- Arx, J.A.von.** (1973). The genus *Petrellidium* and *Pithoascus* (Microascaceae) Persoonia 8:367-375
- Arx, J.A. von.; Guarro, J. & Figueras, M.J.** (1988). Sordaria-ceous ascomycetes without ascospore ejaculations. Nova Hedwigia Beih. 84:1-103
- Bakerspigel A, Schaus, D.** (1984). Petriellidiosis (pseudallescheriasis) in southwestern Ontario, Canada. Sabouraudia 22:247-249
- Bonduel, M.; Santos, P.; Turienzo, C.F.; Chantada, G, Paga-nini H.** (2001). Atypical skin lesions caused by *Curvularia* sp. and *Pseudallescheria boydii* in two patients after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 27:1311-1313
- Blyth, C.C.; Harun, A.; Middleton, P.G. et al.** (2010). Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. J. Clin. Microbiol. 48:314-6
- Briones, E et al.,** (2006). Neumonía grave por *Scedosporium apiospermum* en paciente con síndrome de Goodpasture. Soc. Chil. de Nefrología. Congreso 2006 Valdivia. Libro Resúmenes pág. 18
- Castellani, A. & Chalmers, A.J.** (1919). Manual of tropical medicine. Williams, Wood, and Co., New York.
- Chanqueo, L. et al.,** (2009). Infección rinosinusal por *Scedosporium apiospermum* en un hospedero inmunocompetente. Rev. Chil. Infect. 26 (5): 453-456
- Clauben, S. & Schmidt, S.** (1999). Biodegradation of phenylbenzoate and some of its derivatives by *Scedosporium apiospermum* Research in Mycobiology 150:413-420
- Cruywagen, E.M.; de Beer, Z.W.; Roux, J. & Wingfield, M.J.** (2010). Three new *Graphium* species from baobab trees in South Africa and Madagascar. Peersoonia 25:61-71
- Cooke, W.B. & Kahler, P.G.** (1955). Isolation of potentially pathogenic fungi from polluted water and sewage. Publ. Health. Rep. 170:689-694
- Cortez, K.J et al.,** (2008). Infections Caused by *Scedosporium* spp. Clin. Microbiol. Rev. 21:157-197
- Dabrowa, N.; Landau, J.W.; Newcomer, V.D. & Plunkett, O.A.** (1964). A survey of tidewashed coastal areas of Southern California for fungi potentially pathogenic to man. Mycopathologia 24:136-150
- Dalton, P.; Munckhof, W. & Walters DW.** (2006). *Scedosporium prolificans*: an uncommon cause of septic arthritis. ANZ J. Surg. 76:661-663
- Defontaine, A.; Zouhair, R.; Cimon B, et al.,** (2002). Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 40:2108
- De Hoog, G.S.; Marvin-Sikkema, F.D.; Lahpoor GA, et al.** (1994). Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. Mycoses 37:71-78
- De Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gené, J.; Figueras, M.J.** (2000). Atlas of clinical fungi, 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili, Utrecht, The Netherlands / Reus, Spain.
- De Hoog, G.S.** (2012). ECMM-ISHAM Working Group on *Pseudallescheria/Scedosporium* infections (Internet).
- De Hoog, G.S et al.,** (2011). Making Moulds Meet. Information retrieval as a basis for understanding *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. Mycoses 54 (suppl. 3):1-4
- Delhaes, L.; Harun, A.; Chen, S.C.A, et al.,** (2008). Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. Emerg. Infect. Dis. 14: 282-290
- Díaz, M.C, et al.,** (2004). Absceso de herida operatoria por *Scedosporium prolificans*: Primer aislamiento en Chile. Revisión de la literatura. Rev. Chil. Infectología 21:65-69
- Dykstra, M.J.; Salkin, I.F. & McGinnis, M.R.** (1989). An ultrastructural comparison of conidiogenesis in *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium inflatum* and *Scopulariopsis brumptii*. Mycologia 81:896-904
- Eggertsberger, M.; Rainer, J.; Kaltseis, J.; Pöder, P. & de Hoog, G.S.** (2010). Temperature dependence and environmental conditions enhancing the distribution of the opportunistic pathogens *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. (www.scedosporium-ecmm.com/.../Eggertsberger)

- Emmons, C.W.** (1944). *Allescheria boydii* and *Monosporium apiospermum*. Mycologia 36:188-193
- Fessler, R.G., & Brown, F.D.** (1989). Superior sagittal sinus infection with *Petrellidium boydii*: case report. Neurosurgery 24: 604-607
- Gelabert-González, M. et al.** (2010). Absceso cerebral por *Scedosporium apiospermum*. Presentación de un caso con revisión de la literatura. Neurocirugía 21:125-131
- Gilgado F, Cano J, Gene J, Guarro J.** (2005). Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. J. Clin. Microbiol. 43:4930-4942
- Gilgado, F.; Serena, C.; Cano, J.; Gené, J.; Guarro J.** (2006). Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antimicrob. Agents Chemother. 50:4211-4213
- Gilgado, F.; Cano, J.; Gene, J.; Sutton, D.A.; Guarro J.** (2008). Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. J. Clin. Microbiol. 46:766-771
- Gilgado, F.; Gené, J.; Cano, J. & Guarro, J.** (2010). Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleo-morph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. Med. Mycol. 48:122-128
- Guarro, J, et al.** (2006) *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. Med. Mycol. 44:295-327
- Guarro, J.; Gené, J.; Stchigel, A.M. & Figueras, J.** (2012). Atlas of soil Ascomycetes. CBS Biodiversity Series 10, Utrecht, Netherlands
- Gueho, E & de Hoog, G.S.** (1991). Taxonomy of the the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. J. Mycol. Méd. 118:3-9
- Kantarcioglu, A.S.; de Hoog, G.S. & Guarro, J.** (2012). Clinical characteristics and epidemiology of pulmonary pseudallescheriasis. Rev Iberom. Micol. 29:1-13
- Harun, A.; Gilgado, F.; Chen, S. & Meyer, W.** (2009a). Environmental isolation of *Scedosporium* species from the greater Sydney region a link to the emergence of infections in Australia?. Microbiology Australia May:98-101
- Harun, A.; Perdomo, H.; Gilgado, F.; Chen, S.; Cano, J.; Guarro, J, Meyer W.** (2009b). Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches. Medical Mycology 2009, 47:406-414
- Horre, R. et al.,** (2011). Physiological typing of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains using Taxa Profile, a semi-automated, 384-well microtitre system. Mycoses 54(Suppl.3):56-65
- Hughes, S.J.** (1958). Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. Can. J. Bot. 36:727-836
- Issakainen, J.; Jalava, J.; Eerola, E. & Campbell, C.K.** (1997). Relatedness of *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and *Graphium* pro parte based on SSU rDNA sequences. J. Med. Vet. Mycol. 35: 389-398
- Issakainen, J.; Jalava, J.; Saari, J. & Campbell, C.K.** (1999). Relationship of *Scedosporium prolificans* with *Petriella* confirmed by partial LSU rDNA sequences. Mycological Research 103: 1179-1184
- Kaltseis, J. et al.** (2009) Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. Med. Mycol. doi: 10.1080/13693780802585317
- Kirk, P.W.** (1967). A comparison of saline tolerance and sporulation in marine and clinical isolates of *Allescheria boydii* Shear. Mycopathol. Mycol. Appl. 1967; 33: 6575
- Kirschner, R.** (1998). Diversität mit Borkenkäfern assoziierter fila-mentöser Mikropilze. PhD thesis, Biologische Fakultät. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Germany.
- Krasny, L. et al.,** (2011). *Scedosporium* and *Pseudallescheria* low molecular weight metabolites revealed by database search. Mycoses 54 (Suppl.3):37- 42
- Kumar, D.; Sigler, L.; Gibas, C.F.; Mohan, S.; Schuh, A. et al.,** (2007). *Graphium basitruncatum* fungemia in a patient with acute leukemia. Journal of Clinical Microbiology 45:1644-1647
- Lackner, M.A.H.G.; Gerrits van den Ende.; Kaltseis, J. & de Hoog, G.S.** (2010): Taxonomy, barcoding and diagnostics of therapy refractory *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species. Scedosporium Meeting (www.scedosporium-ecmm.com/.../Lackner2_3rd...
- Lackner, M. et al.,** (2011a). Rapid Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* Strains by Using Rolling Circle Amplification Applied and Environmental Microbiology 78:126-133
- Lackner M. et al.,** (2011b). Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An in vitro antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. Mycoses 54 (Suppl. 3):12-21
- Lackner, M. & de Hoog, G.S.** (2011). *Parascedosporium* and its relatives: phylogeny and ecological trends. IMA Fungus 2:39-48
- Lackner, M.; Klaassen, C.H.; Meis, J.F.; van den Ende, A.H.; de Hoog, G.S.** (2012). Molecular identification tools for sibling

- species of *Scedosporium* and *Pseudallescheria*. Med Mycol. 50:497-508
- Lu, Q. *et al.*, (2011). Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* Species by Three Molecular Methods. J. Clin Microbiol 49:960-967
- Malloch, D. (1970). New concepts in the Microascaceae illustrated by two new species. Mycologia 62:727-739
- Malloch, D. & Salkin, I.A. (1984). A new species of *Scedosporium* associated with osteomyelitis in humans. Mycotaxon 21: 247-255
- Oddo, D.; Lobos, T.; González, A. & Fardella, C. (1985). Pseudoallescheriasis pulmonar no invasiva. Un caso con diagnóstico histopatológico y micológico en material obtenido por broncoscopia. Rev. Méd. Chil. 1985:113:999-1003
- Okada, G.; Seifert, K.A.; Takematsu, A.; Yamaoka, Y.; Miyazaki, S.; Tubaki, K. (1998) A molecular phylogenetic reappraisal of the *Graphium* complex based on 18S rDNA sequences. Canadian Journal of Botany 76:1495-1506
- Okada, G.; Jacobs, K.; Kirsits, T.; Louis-Seize, G.W. Seifert, K.A.; Sugita, T.; Takematsu, A.; Wingfield, M.J. (2000). Epitypification of *Graphium penicillioides* Corda, with comments on the phylogeny and taxonomy of Graphium-like synnematous fungi. Studies in Mycology 45:169-188
- Perdomo, Z. (2011). Caracterización fenotípica y molecular de hongos filamentosos oportunistas: *Scedosporium*, *Acremonium*, *Phialemonium*, *Lecythophora* y *Paecilomyces*. Tesis Doctoral, Universitat Rovira i Virgili, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Reus, España.
- Rainer, J. & de Hoog, G.S. (2006). Molecular taxonomy and ecology of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium prolificans* (Microascaceae) containing opportunistic agents on human. Mycological Res. 110:151-160
- Rainer, J.; Kaltseis, J.; de Hoog, G.S. & Summerbell, R. (2008). Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antonie van Leeuwenhoek 93:315-322
- Rainer, J. & Kaltseis, J. (2010). Diversity in *Scedosporium dehoogii* (Microascaceae): *S. deficiens* sp. nov. Sydowia 62:137-147
- Rodriguez-Tudela, J.L. *et al.* (2009). Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. Med. Mycol. 47:359-370
- Ruiz-Diez, B.; Martin-Diez, F.; Rodriguez-Tudela, J.L., Alvarez, M.; Martinez-Suarez, J.V. (1997). Use of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and PCR fingerprinting for genotyping of a *Scedosporium prolificans* (*inflatum*) outbreak in four leukaemic patients. Curr. Microbiol. 35:186-190
- San Millan, R.; Quindós, G.; Garaizar, J. *et al.*, (1997). Characterization of *Scedosporium prolificans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 35:2270-2274
- Shear, C.L. (1922). Life history of an undescribed ascomycete isolated from a granular mycetoma of man. Mycologia 14:239-243
- Sitterle, E. *et al.*, (2012). Utilisation du MALDI-TOF-MS pour l'identification rapide et précise des espèces cliniques de *Scedosporium* et de *Pseudallescheria*. Medical Mycology 22:100-101
- Sole, M.; Cano, J.; Rodriguez-Tudela, L. *et al.* (2003). Molecular typing of clinical and environmental isolates of *Scedosporium prolificans* by inter-simple-sequence-repeat polymerase chain reaction. Med. Mycol. 41:293-300
- Steinmann, J.; Schmidt, D.; Buer, J. & Rath, P.M. (2011). Discrimination of *Scedosporium prolificans* against *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium apiospermum* by semiauto-mated repetitive sequence-based PCR. Med. Mycol. 49:475-83
- Ullig, J.K.; Ullig, K.; Cano, J. & Guarro, J. (2008). A study of the growth of *Pseudallescheria boydii* isolates from sewage sludge and clinical sources on tributyrin, rapeseed oil, biodiesel oil and diesel oil. Ann. Agric. Environ. Med. 15:45-49
- Vuillemin, P. (1910). Description d'un type de chaque ordre de Conidiosporés. Bulletin des Séances du Société des Sciences de Nancy, Sér. 3, 11:138-143
- Zeng, J.S.; Fukushima, K.; Takizawa, K. *et al.*, (2007). Intraspecific diversity of species of *Pseudallescheria boydii* complex. Med. Mycol. 45:547-558
- Zouhair, R.; Defontaine, A.; Ollivier, C. *et al.*, (2001). Typing of *Scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. J. Med. Microbiol. 50:925-932
- Walt, A.E. (2001). *Pseudallescheria*: an underdiagnosed fungus? Diagn. Cytopathol. 25:153-157
- Wedde, M.; Muller, T.; Tintelnot, K. De Hoog, G.S.; U. Stahl. (1998). PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. Med. Mycol. 36:61-67
- Williamson, E.; Speers, D.; Arthur, I.H. *et al.*, (2001). Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. J. Clin. Microbiol. 39:47-50