

El diagnóstico molecular en las infecciones parasitarias y fúngicas

Rafael Borrás Salvador^a, Manuel Cuenca-Estrella^b, María Victoria Domínguez Márquez^c e Ignacio Gadea Gironés^d

^aDepartamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Clínico Universitario. Valencia. España.

^bServicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

^cServicio de Microbiología. Hospital Universitario La Ribera. Alzira. Valencia. España.

^dDepartamento de Microbiología. Fundación Jiménez Díaz-UTE. Madrid. España.

El diagnóstico microbiológico convencional de las infecciones fúngicas y parasitarias se ha caracterizado por su escasa sensibilidad diagnóstica, su laboriosidad y la necesidad de microscopistas experimentados. Frente a ellos, los métodos diagnósticos basados en la detección de ácidos nucleicos son una alternativa magnífica para superar estos problemas, aunque todavía no han dado respuesta satisfactoria a todas las situaciones. Los métodos moleculares utilizados son variados, la mayoría basados en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, y han demostrado ser útiles para los diagnósticos micológico y parasitológico, los estudios epidemiológicos y taxonómicos, y para el seguimiento de la respuesta a los diferentes tratamientos y la detección de resistencias. Es posible que su implantación presente dificultades en los países en vías de desarrollo, debido a su mayor coste; pero los métodos de diagnóstico molecular ya comienzan a extenderse en los laboratorios de microbiología clínica y rivalizan, con éxito, con los métodos clásicos. En este trabajo, nos proponemos revisar la situación actual de los métodos moleculares en el diagnóstico de las infecciones fúngicas y parasitarias.

Palabras clave: Micosis. Parasitosis. Diagnóstico molecular. PCR.

Molecular diagnosis of parasitic and fungal infections

Conventional microbiological diagnosis of fungal infections and parasitic diseases has been characterized by low diagnostic sensitivity, laboriousness, and the need for expert microscopists. Consequently, diagnostic methods based on the detection of nucleic acids are a magnificent alternative to overcome these problems, but have not yet provided a satisfactory response in all situations. The

molecular methods used are varied and most are based on techniques of nucleic acid amplification. These techniques have proved useful for mycological and parasitological diagnosis, for epidemiological and taxonomic studies, and for monitoring the response to different treatments and detection of resistance. The introduction of these techniques in developing countries may be hampered by their higher cost but molecular diagnostic methods are already beginning to spread in clinical microbiology laboratories and are competing successfully with traditional methods. The present article reviews the current status of molecular methods in the diagnosis of fungal and parasitic infections.

Key words: Mycosis. Parasitic diseases. Molecular diagnosis. PCR.

Métodos moleculares en parasitología

El diagnóstico convencional de las parasitosis es fundamentalmente directo, y la observación microscópica de preparaciones húmedas o teñidas es el procedimiento de referencia, ya que permite realizar los estudios morfológicos necesarios para la diferenciación de las especies. Se trata de un procedimiento barato, pero laborioso y, en ocasiones, de difícil interpretación, lo que determina la necesidad de disponer en los laboratorios de microbiología clínica de microscopistas experimentados y de procedimientos diagnósticos complementarios, tanto directos como indirectos, que aseguren la calidad del diagnóstico parasitológico. Por otra parte, los estudios serológicos están indicados en el diagnóstico de la fase prepatente de las helmintosis con periplo tisular y de las parasitosis tisulares, pero la complejidad antigénica de los parásitos limita la obtención de preparados antigénicos purificados y, en consecuencia, se utilizan antígenos crudos que reducen la sensibilidad y la especificidad de las técnicas serológicas^{1,2}.

En los últimos años, se han desarrollado procedimientos basados en la detección de antígenos y de ácidos nucleicos parasitarios, que han supuesto un importante avance diagnóstico. Primero fueron las técnicas de hibridación de ácido desoxirribonucleico (ADN); pero rápidamente se sustituyeron por procedimientos más sensibles basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

Correspondencia: Dr. I. Gadea Gironés.
Departamento de Microbiología. Fundación Jiménez Díaz-UTE.
Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: igadea@fjd.es

que se han utilizado con éxito para fines diagnósticos, epidemiológicos y taxonómicos^{2,3}. En el campo del diagnóstico parasitológico, la PCR convencional, de tecnología moderada, fue la primera en aplicarse y la más extendida; pero la PCR en tiempo real la está desplazando paulatinamente, aunque tiene una sofisticación tecnológica y coste mayores. Las LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) son PCR de baja complejidad, que sólo requieren de un incubador o de un baño María a 60 °C, y se utilizan en zonas endémicas con menos recursos⁴⁻⁶. En este apartado, nos ocuparemos de la utilidad de los métodos de biología molecular en el diagnóstico del paludismo, de las leishmaniosis y tripanosomosis, y de las amebiasis intestinal y extraintestinal.

Diagnóstico del paludismo

El paludismo o malaria es una enfermedad parasitaria mayor, de transmisión vectorial, transmitida por las hembras hematofagas de los mosquitos del género *Anopheles*, producida por especies antropofíticas, y excepcionalmente zoonóticas⁷, del género *Plasmodium*. El diagnóstico convencional del paludismo se realiza mediante la observación microscópica minuciosa de preparaciones sanguíneas teñidas por el método de Giemsa¹.

Respecto al diagnóstico por métodos moleculares, los primeros ensayos diagnósticos mediante PCR se sustituyeron rápidamente por procedimientos no isotópicos que, mediante la utilización de 4 cebadores específicos de especie, cuya diana son secuencias del gen que codifica la subunidad menor del ARN ribosómico (*SSUrRNA*), permiten simultáneamente el diagnóstico y la identificación de las 4 especies que afectan al hombre. De este grupo de técnicas, la que mostró más sensibilidad fue una *nested*-PCR, con umbral de detección de 1 parásito/μl de sangre, que permitió demostrar que la prevalencia de infecciones mixtas y asintomáticas era superior a la detectada mediante microscopía⁸. La *nested*-PCR se considera el método de referencia, y permite el seguimiento del tratamiento y la detección de resistencias⁹⁻¹¹. Se han descrito diferentes modificaciones, una de las cuales permite detectar ADN de *Plasmodium falciparum* en orina y saliva¹². Pero la *nested*-PCR no resuelve la necesidad de cuantificar la carga parasitaria. Con este fin, se han desarrollado métodos cuantitativos basados en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos del gen *SSUrRNA* (QT-NASBA), de PCR en tiempo real, y técnicas híbridas (QT-NASBA en tiempo real), de los cuales los más prometedores son los de PCR en tiempo real; además, su sensibilidad y especificidad son similares a los comunicados para la *nested*-PCR¹³.

Diagnóstico de las leishmaniosis

Las leishmaniosis son retículo-histiocitosis parasitarias producidas por protozoos flagelados de ciclo vital heteroxénico, de transmisión vectorial, pertenecientes al género *Leishmania*. Desde el punto de vista clínico-biológico, se pueden diferenciar 2 formas polares, las leishmaniosis cutánea y visceral (LV), y 2 formas interpolares, las leishmaniosis cutaneomucosa y cutaneodifusa⁴. El diagnóstico etiológico clásico se basa en la observación microscópica de los amastigotes en los frotis teñidos por el método de Giemsa, o de los promastigotes obtenidos mediante cultivo en el medio NNN (Novy-Nicolle-McNeal) o en el medio de Schneider para *Drosophila*. Recien-

temente, se han desarrollado métodos con el antígeno recombinante k39 de *Leishmania infantum* para detectar anticuerpos séricos, y un método de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas para detectar antígeno de *Leishmania donovani* complex en la orina de los pacientes con sospecha de LV, con sensibilidad y especificidad próximas al 100% en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)^{4,14}.

En los últimos años, se han desarrollado protocolos de PCR convencional que, a partir de diferentes dianas (secuencias de los genes *SSUrRNA*, *gp63* o *G6PD*, miniexones, minicírculos del ADN del kinetoplasto [kADN], secuencias teloméricas o nucleares repetidas), se han utilizado con éxito para diagnosticar y diferenciar las especies¹⁵. Los escasos estudios comparativos que hay sobre la sensibilidad-especificidad de los diferentes protocolos señalan que la PCR-kADN es una de las técnicas más adecuadas⁴, la cual ha permitido el diagnóstico de LV a partir de frotis teñidos por el método de Giemsa, de sangre periférica de pacientes asintomáticos infectados por el VIH, y de muestras urinarias de pacientes sintomáticos inmunocompetentes¹⁶⁻¹⁸. También se han desarrollado protocolos de *nested*-PCR que, además de interés diagnóstico, se han demostrado útiles como herramientas para el seguimiento del tratamiento y la predicción de posibles recaídas¹⁹, así como procedimientos cuantitativos QT-NASBA y protocolos de PCR en tiempo real, estos últimos con especificidad del 100% y un umbral de detección < 1 parásito/μl, que permiten el diagnóstico, la diferenciación de especies y la cuantificación de los parásitos en un corto período, así como también el seguimiento del tratamiento²⁰.

Diagnóstico de las tripanosomosis humanas

Las tripanosomosis humanas son protozoosis hemáticas y tisulares de transmisión vectorial producidas por protozoos flagelados del género *Trypanosoma*: *Trypanosoma brucei* complex y *Trypanosoma cruzi*, agentes etiológicos de las tripanosomosis humana africana (enfermedad del sueño) y americana (enfermedad de Chagas), respectivamente²¹.

Enfermedad del sueño

La enfermedad del sueño presenta 3 estadios clínicos (fase de multiplicación local, fase de diseminación linfático-sanguínea y fase de polarización encefálica), con discretas diferencias biológicas referentes al grado de parasitemia, que es superior en la forma aguda producida por *T. brucei rhodesiense*. El algoritmo diagnóstico recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) consiste en el cribado serológico de la población en riesgo. Pero la existencia de falsos positivos es relativamente importante, dada la reactividad cruzada, por lo que se recomienda que el diagnóstico definitivo sea de tipo directo, basado en la observación microscópica de preparaciones teñidas por el método de Giemsa, y en el cultivo en el medio NNN, poco sensible y muy lento. Por otro lado, la persistencia de valores de anticuerpos elevados, tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo, meses o años después del tratamiento, impide su uso en el seguimiento del tratamiento y el control de las recaídas²².

Las primeras técnicas moleculares encaminadas a diferenciar entre ambas subespecies de *T. brucei* consistieron

en análisis isoenzimáticos y cariotípicos, y en estudios del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphisms*), de minisatélites y microsátélites, y del kADN, si bien han sido las técnicas de PCR las que han alcanzado una preconización mayor. Los primeros ensayos realizados utilizando cebadores, que amplifican los genes 6 y 7 del sitio de expresión asociado (*ESAG 6-7*) al gen que codifica la glucoproteína VSG de *T. brucei* complex, permitieron demostrar la existencia del parásito meses antes de la primera detección parasitológica y su potencial utilidad en el diagnóstico de las infecciones sin parasitemia aparente; pero estos cebadores no permitían la diferenciación en el ámbito subespecie. En la actualidad, se dispone de PCR específicas de subespecie que, en el caso de *T. brucei gambiense*, amplifican el gen de una glucoproteína específica (*TgsGP*), mientras que en *T. brucei rhodesiense* detectan genes *SRA* asociados con la resistencia al poder tripanocida del suero^{23,24}.

Los ensayos más recientes y que se han presentado como los más rápidos y sensibles en la detección de *T. brucei* complex en muestras de sangre humana son las técnicas de PCR en tiempo real, con límites de detección de 0,1 tripanosoma/μl, y que, además, permiten su cuantificación²⁵. Por otro lado, se están dedicando muchos esfuerzos a simplificar los métodos moleculares para que se puedan realizar en las áreas de endemia en el ámbito clínico y en hospitales locales, usando reacciones de amplificación isotérmicas (LAMP)²⁶.

La presencia de una PCR positiva representa una infección activa, ya que la persistencia del ADN de tripanosomas muertos en la sangre no es superior a 2 días. Las herramientas que tienen en cuenta el grado de inflamación del sistema nervioso, como son el recuento leucocitario o la proteinorraquia, son más eficaces que la detección de ADN parasitario mediante PCR para el diagnóstico de afectación del sistema nervioso central. Por tanto, las técnicas de biología molecular son una herramienta útil para detectar y determinar las diferentes especies, pero aún no está completamente definido su papel en el diagnóstico de la tripanosomosis africana²⁷.

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas presenta 3 estadios evolutivos, que determinan las estrategias a seguir para obtener un diagnóstico etiológico de certeza: a) fase aguda, asintomática o sintomática, caracterizada por una moderada o importante parasitemia y la presencia de anticuerpos específicos; b) fase de latencia, asintomática, con parasitemia escasa e intermitente y con anticuerpos específicos, y c) fase crónica, sintomática, comúnmente sin parasitemia, y con anticuerpos específicos²¹. En la fase aguda sintomática, las pesquisas diagnósticas se deben centrar en observar de forma microscópica preparaciones de sangre teñidas por el método de Giemsa, el cultivo en los medios NNN o LIT y el xenodiagnóstico. Mientras que en las fases de latencia y crónica el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos específicos, aunque la presencia de reacciones cruzadas limita su utilidad²¹.

La detección temprana del parásito se ha conseguido con el desarrollo de métodos moleculares basados en la PCR. Estos ensayos muestran valores de sensibilidad muy variables, entre el 44,6 y el 100% en humanos, dife-

rencias que podrían explicarse por las variaciones genéticas del parásito o por los protocolos utilizados. Se han analizado múltiples dianas para detectar parasitemias bajas, siendo las secuencias altamente repetitivas, como los fragmentos de 330 pb del minicírculo del kADN y de 185-195 pb del ADN satélite nuclear, las que han ofrecido un rendimiento más elevado^{28,29}.

Las técnicas de PCR han demostrado que las poblaciones naturales de *T. cruzi* muestran una marcada divergencia clonal, que ha permitido la diferenciación de 2 líneas filogenéticas (*T. cruzi* I y *T. cruzi* II), una de ellas con 5 subtipos (TCIIa a TCIIe), con diferente distribución geográfica y ecológica³⁰. Además, han permitido la detección de infecciones policlonales, y han demostrado su utilidad en el seguimiento terapéutico y en la diferenciación entre *T. cruzi* y *T. rangeli*³¹⁻³³.

La PCR a tiempo real se presenta como alternativa a la *nested*-PCR, con una concordancia del 90% y una especificidad del 100%; pero su sensibilidad varía con el volumen de muestra analizado (50% para 0,8 ml frente a 95% para 2 ml)³⁴.

Diagnósticos de la amebiasis intestinal y extraintestinal

La amebiasis es la parasitación sintomática o asintomática producida por *Entamoeba histolytica*. Estudios morfológicos, isoenzimáticos y genéticos han revelado que *E. histolytica* era un complejo de especies y han permitido la descripción de *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba moshkovskii* y *Entamoeba dispar*, especies no patógenas, y *E. histolytica*, sensu stricto. De acuerdo con la OMS, las parasitaciones por *E. histolytica* deben tratarse, incluso en los portadores asintomáticos. De modo que la adecuada diferenciación de especies es imprescindible para evitar infradiagnósticos y tratamientos innecesarios^{35,36}.

El diagnóstico convencional de la parasitación intestinal consiste en la observación microscópica de los trofozoítos y de los quistes en muestras fecales directas o concentradas. Pero este procedimiento no permite diferenciar siempre *E. histolytica* de otras amebas morfológicamente idénticas no patógenas. Mientras que, en las formas extraintestinales el diagnóstico normalmente se establece mediante la detección de anticuerpos. Pero los métodos serológicos sólo son útiles en países no endémicos o de prevalencia baja, ya que los anticuerpos persisten, aunque se resuelva la parasitación. Con el fin de mejorar el diagnóstico, se han desarrollado métodos para detectar antígenos en heces y otras muestras biológicas, y para la amplificación de ácidos nucleicos. Estudios comparativos realizados con ambos procedimientos demuestran que la sensibilidad de las técnicas de PCR es 100 veces superior a las de la detección de antígenos³⁷. Las principales dianas utilizadas para las técnicas de PCR son secuencias multicopias, como *SSUrRNA* y las repeticiones episómicas. El objetivo es detectar y diferenciar simultáneamente *E. histolytica* de *E. dispar*, para lo cual se han desarrollado diferentes protocolos de PCR convencional, *nested*-PCR, y PCR en tiempo real. Las técnicas de PCR en tiempo real son las más sensibles y específicas, con la ventaja añadida de que disminuyen el tiempo de post-análisis, al amplificar y detectar en la misma reacción. Se obtienen resultados numéricos fácilmente interpretables

y permiten analizar cargas parasitarias, de interés en estudios epidemiológicos y en muestras ambientales³⁸. Para el diagnóstico de las formas extraintestinales, se ha desarrollado una *nested* multiplex-PCR que permite la detección de ADN en el material del absceso y en la orina con sensibilidades del 100 y el 40%, respectivamente. La detección en orina del ADN resulta especialmente útil en el seguimiento del tratamiento con metronidazol³⁹.

Técnicas moleculares en micología

La utilidad de la biología molecular en el diagnóstico micológico se ha incrementado en los últimos años. Esto se debe, en gran medida, al aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas. Las técnicas moleculares llegaron con retraso a la micología desde otros campos microbiológicos, debido a que las infecciones fúngicas invasoras se consideraban poco frecuentes, y a que las técnicas convencionales de examen microscópico y cultivo constituían los métodos de referencia. Sin embargo, las infecciones fúngicas invasoras se han convertido en enfermedades muy frecuentes en pacientes con factores predisponentes, entre los que destacan las neoplasias sólidas, las enfermedades hematológicas, los trasplantes de órgano sólido, los tratamientos inmunodepresores, los ingresos en unidades de cuidados intensivos y algunas intervenciones quirúrgicas. Estas infecciones tienen una elevada mortalidad, ya que suelen diagnosticarse de forma tardía, cuando se encuentran muy extendidas, por lo que no suelen responder al tratamiento antifúngico⁴⁰⁻⁴².

La elevada mortalidad de las micosis invasoras ha hecho que se replanteen los procedimientos diagnósticos y terapéuticos. En muchos aspectos, el diagnóstico de estas infecciones sigue basado en los métodos microbiológicos tradicionales y en las pruebas de imagen. No obstante, en los últimos años se están desarrollando técnicas diagnósticas moleculares para detectar patógenos fúngicos. Algunas de estas técnicas empiezan a tener utilidad clínica, como veremos a continuación.

Cuando se hace referencia en micología a técnicas diagnósticas basadas en la biología molecular, se está hablando, fundamentalmente, de métodos de amplificación de ácidos nucleicos que utilizan la PCR. Estos métodos se han tomado del mundo de la virología y de la bacteriología, donde se empezaron a utilizar antes que en micología. Las técnicas moleculares tienen 4 aplicaciones diagnósticas principales en micología:

1. Aplicaciones taxonómicas para identificar las especies fúngicas.
2. Diagnóstico clínico temprano de las infecciones fúngicas.
3. Detección de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos.
4. Tipificación subespecífica de cepas clínicas.

Aplicaciones taxonómicas

La simplificación de las técnicas moleculares ha permitido su aplicación en muchos laboratorios microbiológicos especializados en identificar y clasificar microorganismos. Estos laboratorios utilizaban métodos clásicos basados en la morfología macroscópica y microscópica de las colonias y en pruebas bioquímicas confirmatorias. En mi-

cología, la clasificación taxonómica de referencia se fundamenta en métodos tomados tanto del campo de la microbiología, como del de la botánica. La identificación clásica se realiza observando unas determinadas estructuras morfológicas que permiten clasificar el organismo dentro de un género y, tras ello, identificar la especie mediante pruebas confirmatorias (bioquímicas, crecimiento diferencial, etc.).

La clasificación clásica siempre ha tenido limitaciones muy significativas. En primer lugar, la observación de estructuras características sólo se consigue si el hongo es cultivado en determinadas condiciones y, a veces, es necesario conseguir que el microorganismo se reproduzca sexualmente. Todo este proceso necesita tiempo y expertos que puedan reconocer las estructuras identificativas⁴³. Por estas razones, la identificación fúngica de especie se convirtió en una especialidad, al alcance de unos pocos centros de referencia y con escasa utilidad clínica.

En los últimos años, la aparición de nuevas moléculas antifúngicas con diferentes espectros de actividad, y la descripción de cepas y de especies fúngicas resistentes a los antibióticos, han aumentado el interés por la clasificación de las cepas clínicas al nivel de especie. No todas las infecciones fúngicas deben tratarse igual, ya que hay especies que son insensibles a algunas de las alternativas terapéuticas actuales. Por ejemplo, los basidiomycota son insensibles a las cándidas, y los mucorales son insensibles a voriconazol y a las cándidas⁴⁴. Este interés, unido a la difusión de las técnicas moleculares, ha permitido que se desarrollen nuevos métodos de identificación, más rápidos, con la intención de que sean útiles desde el punto de vista asistencial, aunque esto último está aún por conseguir. Los resultados de los métodos moleculares están produciendo reclasificaciones taxonómicas en muchos géneros fúngicos⁴⁵⁻⁴⁸. Se están describiendo nuevas especies y se están dividiendo especies conocidas en diferentes taxones. Este es el caso de *Trichosporon beigeli*, que ha desaparecido como especie, y se ha desligado en al menos 18 especies nuevas, mediante técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos⁴⁹.

Pero estos métodos moleculares presentan aún varias limitaciones. Una de ellas es la elección de la diana que debe amplificarse y secuenciarse. En ocasiones, según se secuencie una u otra diana, la clasificación taxonómica puede cambiar. La región que se emplea con más frecuencia como diana para detectar ADN fúngico e identificar especies es la que codifica el complejo ribosómico (genes *18S*, *5,8S* y *28S*). Estos genes contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos, dominios variables y regiones espaciadoras internas, altamente variables. Las zonas variables se pueden emplear para clasificar las especies, ya que permiten diseñar sondas y cebadores que hibriden y detecten tanto secuencias muy conservadas e inespecíficas, como variables y muy específicas, dependiendo del objetivo del método de detección⁴⁵⁻⁴⁸. Sin embargo, la elección de la diana no resulta sencilla para algunas especies, y, a veces, es necesario secuenciar varias dianas para poder distinguir entre ellas. Así, por ejemplo, los primeros estudios taxonómicos que se realizaron con el gen *18S* del ADN ribosómico en cepas de *Candida*, *Aspergillus*, dermatofitos y hongos endémicos demostraron que había una gran homología de secuencia, por lo que era necesario secuenciar dianas com-

plementarias o fragmentos de ADN de una gran longitud para poder distinguir entre especies. Algo parecido ocurrió con el gen de la subunidad 28S, aunque hay 2 regiones variables (D1/D2) dentro de este gen que se han empleado para estudios de clasificación taxonómica, principalmente con levaduras⁵⁰.

Finalmente, los expertos han elegido utilizar las regiones variables que incluyen los espaciadores transcriptores internos (ITS1 e ITS2), los espaciadores intergénicos (IGS) y el gen de la subunidad 5,8S. Actualmente, las regiones ITS son las más utilizadas para identificar hongos, ya que tienen secuencias con variabilidad interespecie y su pequeño tamaño facilita el estudio y la comparación de la secuencia^{46,49}. No obstante, estas dianas no son aplicables para clasificar todas las especies. Así, por ejemplo, la distinción entre las diferentes especies de *Trichosporon* necesita de la secuenciación de los IGS, de *Aspergillus* spp. del gen de la beta tubulina, y de *Fusarium* spp. del factor de elongación alfa^{46,49,51}. En 2008, varios expertos están tomando parte en una iniciativa con la intención de alcanzar un consenso sobre qué dianas deben secuenciarse para identificar las especies fúngicas.

Otro tema polémico en la identificación molecular es la elección de la prueba estadística que debe utilizarse para analizar los resultados de la secuenciación y, por supuesto, qué distancia genética debe considerarse definitoria de especie en organismos que pueden reproducirse asexualmente. Este asunto queda fuera de los objetivos del monográfico, pero debe señalarse que, dependiendo del criterio que se escoja, los resultados de la clasificación pueden variar. Muchos expertos realizan las identificaciones analizando los porcentajes de homología entre las secuencias. Sin embargo, hay un consenso cada vez más generalizado en que la mejor forma de clasificar las especies microscópicas es mediante análisis filogenéticos. Este concepto evolutivo acepta que la clasificación de las especies debe basarse en el criterio de la descendencia desde un ancestro común. El análisis evolutivo requiere de la utilización de pruebas probabilísticas que pueden realizarse mediante programas informáticos, ya disponibles en muchos laboratorios⁵⁰.

Toda esta complejidad puede poner en duda la utilidad clínica de la identificación molecular. Si hacen falta expertos y equipos altamente especializados, y si hay dudas sobre los criterios de clasificación, es difícil que puedan considerarse técnicas aplicables a la práctica habitual de un laboratorio asistencial. En la actualidad, la identificación molecular sigue reducida a los laboratorios de referencia. En ocasiones, la identificación molecular sólo ha servido para complicar tremendamente la clasificación taxonómica de un género, sin que ayude a obtener resultados útiles^{46,47}. No obstante, hoy sabemos que hay determinadas especies fúngicas que son más resistentes que otras a determinados antifúngicos, y que sólo se pueden distinguir mediante identificación molecular. En estos casos, el laboratorio asistencial debe conocer que es más rápido realizar un estudio de sensibilidad que una identificación molecular. Por ejemplo, es más sencillo realizar el estudio de sensibilidad de una presunta cepa clínica de *Trichosporon*, que realizar la identificación por secuenciación de IGS e ITS, que es la única forma de distinguir las especies que son resistentes a anfotericina B de las que son sensibles⁴⁹.

Para finalizar, debe enfatizarse que la identificación molecular se convertirá en la técnica de referencia en un futuro próximo. La difusión y la estandarización que se está realizando hoy día indican que se seguirá por ese camino. Los nuevos métodos que incorporan sistemas de hibridación para cientos o miles de secuencias, como los *microarrays*, pueden simplificar, acelerar y automatizar todo este proceso, acercándolo a la clínica diaria⁵².

Diagnóstico clínico temprano de las infecciones fúngicas

Como se indicó anteriormente, una de las causas principales de la elevada mortalidad de las infecciones fúngicas invasoras es el retraso en el diagnóstico de la infección. Por ello, se han desarrollado técnicas de diagnóstico temprano que se basan en la detección de componentes fúngicos y que se conocen con el nombre genérico de *métodos alternativos al cultivo*⁴³. En micología, se han desarrollado varias técnicas de detección antigénica, como el antígeno de *Cryptococcus*, el galactomanano de *Aspergillus*, el manano de *Candida* o el betaglucano, que es un método de detección panfúngica. Si se exceptúa el antígeno criptocócico, que tiene unos valores predictivos muy elevados, las otras técnicas tienen una utilidad limitada. Debe resaltarse que la detección de galactomanano ha demostrado una buena utilidad en pacientes oncohematológicos con riesgo alto de aspergilosis, tanto en suero como, según trabajos recientes, en lavado broncoalveolar⁴³. Además de la detección antigénica, se están desarrollando técnicas de detección de ácidos nucleicos, cuya rentabilidad es discreta. No obstante, algunas de estas sí que empiezan a ocupar un lugar entre los métodos de diagnóstico clínico.

La mayor parte de los métodos de detección de ácidos nucleicos se han desarrollado para diagnosticar la aspergilosis, la micosis más frecuente y con una mortalidad mayor en algunos grupos de pacientes inmunodeprimidos, y han empleado métodos de amplificación basados en la PCR^{43,53}. En términos generales, esta PCR diagnóstica tiene una eficacia diagnóstica dudosa y debe considerarse como una técnica complementaria en fase de desarrollo. Un factor a destacar es la falta de estandarización de esta técnica, ya que en cada laboratorio se trabaja con aproximaciones diferentes en cuanto a modo de extracción, sondas, cebadores, condiciones de la PCR y cuantificación. Sí que hay un acuerdo generalizado acerca de que debe emplearse PCR cuantitativa, ya que permite distinguir colonizaciones de infecciones y, posiblemente, realizar el seguimiento de la respuesta al tratamiento. Se han empezado a comercializar algunas de estas técnicas, como la incluida en el equipo diagnóstico SeptiFast (Roche Diagnostic SL), y otras, gracias a la actividad de pequeñas empresas de base tecnológica. La sensibilidad de esta técnica es variable, según el trabajo consultado, pero es elevada en muestras respiratorias y algo más baja en sangre y suero debido a los problemas de inhibición. En general, sus valores predictivos negativos son muy altos, lo que puede tener utilidad en muchos pacientes⁵⁴. La mayor parte de las técnicas de PCR diagnóstica de la aspergilosis se dirigen a la diana del fragmento 18S del ADN ribosómico, cuya especificidad es discutible, por lo que otros grupos están desarrollando pruebas dirigidas a los ITS o a otras zonas genómicas. También se está plan-

teando la posibilidad de que las determinaciones con la PCR se realicen de forma seriada, como se recomienda con las determinaciones de galactomanano, pero todavía no hay datos clínicos que nos ayuden a recomendar esta estrategia diagnóstica⁵⁵.

Respecto a otras enfermedades fúngicas hay menos datos. Se han desarrollado métodos de PCR para *Candida*, que se están empleando en pacientes con riesgo de candidemia, como los pacientes críticos. Un trabajo reciente otorga a una técnica de PCR que detecta varias especies de *Candida*, unos valores predictivos positivos y negativos por encima del 90%⁵⁶. Si estas cifras se confirman en estudios posteriores, en los que se incluya un mayor número de pacientes, esta técnica puede constituirse como un método útil desde el punto de vista asistencial. También se han desarrollado técnicas para detectar patógenos emergentes, como mucorales, *Trichosporon*, *Fusarium*, etc., pero no se ha evaluado su aplicabilidad clínica en profundidad^{48,57}.

Por otra parte, las técnicas de detección basadas en la PCR están demostrando una utilidad mayor en el diagnóstico de las infecciones por *Pneumocystis jirovecii* y en el de las micosis endémicas. En el caso de la neumocistosis, se han utilizado numerosas dianas, como los ITS del ADN ribosómico, genes mitocondriales y otros genes que codifican glucoproteínas de superficie. La mayoría de los estudios han obtenido una sensibilidad y especificidad altas, al compararlos con la detección mediante examen directo en muestras respiratorias. Recientemente, se ha desarrollado una PCR cuantitativa en tiempo real, con la intención de diferenciar entre pacientes colonizados e infectados. Los datos obtenidos, aunque preliminares, han indicado una diferenciación potencial entre ambos tipos de individuos. Asimismo, esta técnica se ha empleado para diagnosticar la neumonía por *P. jirovecii*, en un estudio prospectivo^{58,59}.

En cuanto a las micosis endémicas, histoplasmosis, blastomycosis, coccidioidomycosis, paracoccidioidomycosis y penicilliosis, hay pruebas que detectan anticuerpos frente a todas ellas, pero su utilidad es muy limitada en varios grupos de pacientes. En el caso de la histoplasmosis, la detección de un antígeno polisacárido en orina y suero tiene gran utilidad diagnóstica, especialmente en pacientes con sida e infección diseminada, pero esta prueba sólo está disponible en Estados Unidos. Por ello, se han desarrollado técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real para diagnosticar la histoplasmosis⁶⁰. Una de estas técnicas, desarrollada por el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, ha demostrado una sensibilidad total del 80% en un estudio realizado con histoplasmosis probadas. La rentabilidad de la técnica fue superior en muestras respiratorias (100% de sensibilidad), mientras que sólo se detectó ADN en el 70% de los sueros. La especificidad total de la técnica fue del 100%⁶¹. En las otras micosis endémicas hay menos datos. En el caso de la paracoccidioidomycosis, se han desarrollado pruebas con alta sensibilidad, como la detección de anticuerpos y la detección de antígenos en suero de pacientes infectados, que además es útil para el seguimiento de la enfermedad y su respuesta al tratamiento⁶². Recientemente, se han publicado datos sobre técnicas de PCR que permiten diagnosticar la infección de muestras tomadas en lesiones cutáneas y mucosas⁶³.

DetECCIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS

Hasta la simplificación y difusión de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, la detección de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos estaba al alcance de muy pocos laboratorios, alejados de la práctica clínica. Recientemente, se han desarrollado varias pruebas que permiten detectar los mecanismos de resistencia en cepas en cultivo e, incluso, directamente de muestras clínicas.

Varias alteraciones de los genes *ERG11* en levaduras y *CYP51* en hongos filamentosos, que codifican la diana de los azoles, la 14-alfa lanosterol demetilasa, se han relacionado con resistencia a estos fármacos. Entre éstas destacan mutaciones puntuales, sobreexpresión del gen y amplificación genética debida a la duplicación cromosómica; también se ha descrito conversión genética o recombinación mitótica. Lo más habitual es detectar mutaciones puntuales en el gen, que pueden detectarse en cepas y muestras clínicas mediante técnicas de PCR^{64,66}. Otro mecanismo, quizás el que se detecta con mayor frecuencia en cepas clínicas de levaduras, es la reducción de los valores intracelulares de los azoles, que suele deberse a un aumento en las bombas de flujo, lo que conlleva un incremento en la expulsión de estos antifúngicos. Este mecanismo de resistencia secundaria se debe a la sobreexpresión de estas bombas o transportadores. Hay 2 tipos principales, los transportadores ABC (del inglés *ATP binding cassette*) y los MFS (del inglés *major facilitators superfamily*) y pueden detectarse mutaciones en los genes que los codifican, que conllevan un aumento de expresión de las bombas⁶⁷. La resistencia a caspofungina y otras equinocandinas suele deberse a mutaciones de los genes de la vía de la síntesis de glucano. Lo más habitual son mutaciones en el gen *FSK1*. Se han descrito casi una decena de mutaciones puntuales que pueden detectarse en cepas clínicas mediante PCR en tiempo real múltiple⁶⁸.

La difusión de estas técnicas por los laboratorios asistenciales permitiría realizar estudios epidemiológicos con poblaciones salvajes para conocer la prevalencia real de estas mutaciones, superando las limitaciones de los estudios fenotípicos de resistencias y obteniendo información para instaurar el tratamiento antifúngico más adecuado.

TIPIFICACIÓN SUBESPECÍFICA DE CEPAS CLÍNICAS

Esta aplicación de las técnicas moleculares necesitaría de un capítulo propio, pero en esta revisión debe resaltar que la tipificación molecular se ha convertido en la herramienta más adecuada para realizar estudios epidemiológicos microbiológicos y, de esta forma, conocer la cadena de infección y diseñar estrategias eficaces para prevenir y disminuir la incidencia de las enfermedades infecciosas⁶⁹.

En el campo de la micología, se han empleado diversas técnicas de tipificación. Estos métodos se suelen aplicar para analizar brotes de infección intrahospitalaria, así como en estudios de genética poblacional^{50,70}. Se han empleado, entre otras, técnicas de isoenzimas, diferentes métodos de RFLP y técnicas basadas en la PCR, como la de RAPD (del inglés *random amplification of polymorphic DNA*), el SSDP (del inglés *sequence-specific DNA primers*) o el PMM (del inglés *polymorphic microsatellite markers*). Algunas diferencian sólo entre subespecies, pe-

ro otras son capaces de distinguir entre cepas individuales⁶⁹. Recientemente, se ha desarrollado el MLST (del inglés *multilocus sequencing analysis*), un método que se basa en la secuenciación de varias dianas de ADN para realizar estudios genéticos. Este enfoque se está utilizando en la actualidad para analizar poblaciones de *Candida* sp.⁵⁰.

Para finalizar, debe resaltarse que la tipificación subespecífica sólo parece tener utilidad clínica real en ciertas ocasiones, como en brotes producidos por hongos filamentosos en quirófanos⁷¹. En otros medios, como las salas con pacientes inmunodeprimidos, las infecciones se producen por inhalación de conidias o colonización de dispositivos intravasculares por diferentes cepas y, además, la infección suele ser policlonal, lo que complica la tipificación de los casos^{72,73}. Por último, en caso de que se produzca un brote de micosis invasoras en un centro sanitario, debe procederse a tomar muestras ambientales y deberían tipificarse tanto las cepas clínicas como las ambientales, empleando al menos 2 sistemas de análisis de los descritos anteriormente, y un número suficiente de cepas de control sin relación temporal o geográfica.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Borrás R. Parasitología clínica. En: Farmacéuticos CGdCOd, editor. Análisis Clínicos. Madrid: 2005. p. 259-86.
- Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol.* 1997;27:1135-45.
- Navarro C, Dominguez-Marquez MV, Garijo-Toledo MM, Vega-García S, Fernandez-Barredo S, Perez-Gracia MT, et al. High prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs reared under intensive growing systems: Frequency of ribotypes and associated risk factors. *Vet Parasitol.* 2008;153:347-58.
- Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 2007;45:21-5.
- Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1214-9.
- Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem.* 2006;52:303-6.
- Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* 2008;46:165-71.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;61:315-20.
- Suarez-Mutis MC, Cuervo P, Leoratti FM, Moraes-Avila SL, Ferreira AW, Fernandes O, et al. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49:159-64.
- Ayala E, Lescano AG, Gilman RH, Calderon M, Pinedo VV, Terry H, et al. Polymerase chain reaction and molecular genotyping to monitor parasitological response to anti-malarial chemotherapy in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:546-53.
- Mehlotra RK, Fujioka H, Roepe PD, Janneh O, Ursos LM, Jacobs-Lorena V, et al. Evolution of a unique *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance phenotype in association with pfcrt polymorphism in Papua New Guinea and South America. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:12689-94.
- Mharakurwa S, Simoloka C, Thuma PE, Shiff CJ, Sullivan DJ. PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Malar J.* 2006;5:103.
- Gama BE, Silva-Pires Fdo E, Lopes MN, Cardoso MA, Britto C, Torres KL, et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol.* 2007;116:427-32.
- Riera C, Fisa R, Lopez P, Ribera E, Carrio J, Falco V, et al. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:899-904.
- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1435-9.
- Brustoloni YM, Lima RB, Da Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, De Oliveira AL, et al. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:497-500.
- García-García JA, Martín-Sánchez J, Gallego M, Rivero-Roman A, Camacho A, Riera C, et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4455-8.
- Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:151-4.
- Riera C, Fisa R, Ribera E, Carrio J, Falco V, Gallego M, et al. Value of culture and nested polymerase chain reaction of blood in the prediction of relapses in patients co-infected with *Leishmania* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:1012-5.
- Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 2007;9:1307-15.
- Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, et al. The trypanosomiasis. *Lancet.* 2003;362:1469-80.
- Amonneau V, Solano P, Koffi M, Denizot M, Cuny G. Contributions and limits of the diagnosis of human African trypanosomiasis. *Med Sci (Paris).* 2004;20:871-5.
- Radwanska M, Claes F, Magez S, Magnus E, Perez-Morga D, Pays E, et al. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67:289-95.
- Picozzi K, Fevre EM, Odiit M, Carrington M, Eisler MC, Maudlin I, et al. Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *BMJ.* 2005;331:1238-41.
- Becker S, Franco JR, Simarro PP, Stich A, Abel PM, Steverding D. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50:193-9.
- Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5517-24.
- Jamonneau V, Solano P, Garcia A, Lejon V, Dje N, Miezian TW, et al. Stage determination and therapeutic decision in human African trypanosomiasis: value of polymerase chain reaction and immunoglobulin M quantification on the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients in Cote d'Ivoire. *Trop Med Int Health.* 2003;8:589-94.
- Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2421-6.
- Russomando G, Figueredo A, Almiron M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2864-8.
- Miyamoto CT, Gomes ML, Marangon AV, Araujo SM, Bahia MT, Lana M, et al. *Trypanosoma cruzi*: sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. *Exp Parasitol.* 2006;112:198-201.
- Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altcheh J, et al. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:1016-8.
- Flores-Chavez M, Bosseno MF, Bastrenta B, Dalenz JL, Hontebeyrie M, Revollo S, et al. Polymerase chain reaction detection and serologic follow-up after treatment with benznidazole in Bolivian children infected with a natural mixture of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:497-501.
- Saldana A, Samudio F, Miranda A, Herrera LM, Saavedra SP, Caceres L, et al. Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the west-shore of the Panama canal. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:729-31.
- Piron M, Fisa R, Casamitjana N, Lopez-Chejade P, Puig L, Verges M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 2007;103:195-200.

35. Leiva B, Lebbad M, Winiacka-Krusnell J, Altamirano I, Tellez A, Linder E. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Arch Med Res*. 2006;37:529-34.
36. Khairnar K, Parija SC. A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. *BMC Microbiol*. 2007;7:47.
37. Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol*. 1998;36:449-52.
38. Calderaro A, Gorrini C, Bommezzadri S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:450-7.
39. Parija SC, Khairnar K. Detection of excretory *Entamoeba histolytica* DNA in the urine, and detection of *E. histolytica* DNA and lectin antigen in the liver abscess pus for the diagnosis of amoebic liver abscess. *BMC Microbiol*. 2007;7:41.
40. Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almeida M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1829-35.
41. Ascioğlu S, Rex JH, De Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis*. 2002;34:7-14.
42. Gavalda J, Len O, San Juan R, Aguado JM, Fortun J, Lumberras C, et al. Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. *Clin Infect Dis*. 2005;41:52-9.
43. Gadea I, Cuenca-Estrella M. Guidelines for fungal diagnoses and antifungal sensitivity studies. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:32-9.
44. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:917-21.
45. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:748-51.
46. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61: 805-9.
47. Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, et al. Prevalence and Susceptibility Profile of *Candida* metapsilosis and *Candida* orthopsilosis: Results from Population-Based Surveillance of Candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52:1506-9.
48. Nagao K, Ota T, Tanikawa A, Takae Y, Mori T, Udagawa S, et al. Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. *J Dermatol Sci*. 2005;39:23-31.
49. Rodriguez-Tudela JL, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cano V, Tapia C, Perkins A, et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4026-34.
50. Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, et al. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2007;6:1041-52.
51. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus section fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1244-51.
52. Loy A, Bodrossy L. Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin Chim Acta*. 2006;363:106-19.
53. Buitrago MJ, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of *Aspergillus* spp. by real-time PCR in a murine model of pulmonary infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:464-8.
54. Donnelly JP. Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go. *Clin Infect Dis*. 2006;42:487-9.
55. Gomez-Lopez A, Martin-Gomez MT, Martin-Davila P, Lopez-Onrubia P, Gavalda J, Fortun J, et al. Detection of fungal DNA by real-time polymerase chain reaction: evaluation of 2 methodologies in experimental pulmonary aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;56:387-93.
56. McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, et al. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis*. 2008;46:890-6.
57. Osorio S, De la Camara R, Monteserin MC, Granados R, Ona F, Rodriguez-Tudela JL, et al. Recurrent disseminated skin lesions due to *Metarrhizium anisopliae* in an adult patient with acute myelogenous leukemia. *J Clin Microbiol*. 2007;45:651-5.
58. Larsen HH, Kovacs JA, Stock F, Vestereng VH, Lundgren B, Fischer SH, et al. Development of a rapid real-time PCR assay for quantitation of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2989-93.
59. Larsen HH, Von Linstow ML, Lundgren B, Høgh B, Westh H, Lundgren JD. Primary *Pneumocystis* infection in infants hospitalized with acute respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:66-72.
60. Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:665-8.
61. Buitrago MJ, Gomez-Lopez A, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Assessment of a quantitative PCR method for clinical diagnosis of imported histoplasmosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:16-22.
62. Marques da Silva SH, Queiroz-Telles F, Colombo AL, Blotta MH, Lopes JD, Pires De Camargo Z. Monitoring gp43 antigenemia in *Paracoccidioidomycosis* patients during therapy. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2419-24.
63. Ricci G, Da Silva ID, Sano A, Borra RC, Franco M. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with *paracoccidioidomycosis*: correlation with the histopathological pattern. *Pathologica*. 2007;99:41-5.
64. Balashov SV, Gardiner R, Park S, Perlin DS. Rapid, high-throughput, multiplex, real-time PCR for identification of mutations in the *cyp51A* gene of *Aspergillus fumigatus* that confer resistance to itraconazole. *J Clin Microbiol*. 2005;43:214-22.
65. Garcia-Effron G, Dilger A, Alcazar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS. Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1200-6.
66. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51: 1897-904.
67. Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Micheli M, Bille J. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. *Drug Resist Updat*. 1998;1:255-65.
68. Balashov SV, Park S, Perlin DS. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKS1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:2058-63.
69. Cuenca-Estrella M, Mellado E. Are molecular techniques useful in aspergillosis surveillance and control? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21:469-71.
70. Galhardo MC, De Oliveira RM, Valle AC, Paes Rde A, Silvatavares PM, Monzon A, et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol*. 2008;46:141-51.
71. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Gaztelurrutia L, Navarro JI, Tudela JL. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2419-22.
72. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Prieto E, Diaz-Guerra TM, Garcia-Cia JI, Mellado E, et al. Genotyping and antifungal susceptibility profile of *Dipodascus capitatus* isolates causing disseminated infection in seven hematological patients of a tertiary hospital. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1832-6.
73. Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Buendia V, Aspa J, Prieto E, et al. Characterization of a possible nosocomial aspergillosis outbreak. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:543-8.