

Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico

Juan Luis Rodríguez-Tudela, Isabel Cuesta, Alicia Gómez-López, Ana Alastruey-Izquierdo, Leticia Bernal-Martínez y Manuel Cuenca-Estrella

Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

El desarrollo de pruebas moleculares de diagnóstico micológico no ha dejado de aumentar en los últimos años debido al incremento en la prevalencia de las infecciones fúngicas y a la lentitud en alcanzar un diagnóstico mediante las técnicas microbiológicas clásicas. Estas pruebas moleculares están diseñadas para resolver los siguientes aspectos del diagnóstico micológico: a) identificación de especie mediante secuenciación de dianas taxonómicamente relevantes; b) diagnóstico clínico precoz de las infecciones fúngicas; c) detección de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos, y d) tipificación subespecífica de cepas clínicas. Actualmente, estas metodologías siguen circunscritas a centros de referencia tecnológicamente avanzados. No obstante, parece probable que, en breve, algunas de estas técnicas estarán disponibles en los laboratorios asistenciales.

Palabras clave: Técnicas moleculares. Infecciones fúngicas. Diagnóstico.

Molecular techniques in mycology

An increasing number of molecular techniques for the diagnosis of fungal infections have been developed in the last few years, due to the growing prevalence of mycoses and the length of time required for diagnosis when classical microbiological methods are used. These methods are designed to resolve the following aspects of mycological diagnosis: a) Identification of fungi to species level by means of sequencing relevant taxonomic targets; b) early clinical diagnosis of invasive fungal infections; c) detection of molecular mechanisms of resistance to antifungal agents;

and d) molecular typing of fungi. Currently, these methods are restricted to highly developed laboratories. However, some of these techniques will probably be available in daily clinical practice in the near future.

Key words: Molecular techniques. Fungal infections. Diagnosis.

Introducción

El desarrollo de pruebas moleculares para el diagnóstico micológico mantiene una progresión ascendente. Hay diversas razones, pero las más destacadas son el aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas y la lentitud en alcanzar un diagnóstico mediante las técnicas microbiológicas clásicas. Este aumento de prevalencia está relacionado con la existencia de una mayor población de pacientes con factores predisponentes. Por un lado, estos factores están derivados del aumento de la incidencia de las neoplasias sólidas, las enfermedades hematológicas o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y, por otro, del desarrollo científico y tecnológico de la medicina que ofrece alternativas a pacientes con edades avanzadas y con procesos que antes carecían de tratamiento. Entre ellos cabe destacar las nuevas modalidades de trasplante de progenitores hematopoyéticos y trasplante de órgano sólido, los nuevos quimioterápicos y el aumento de la utilización de corticoides a altas dosis. Por último, hay otros factores de riesgo que contribuyen a este aumento de incidencia de la infección fúngica invasiva como es el ingreso en unidades de cuidados intensivos y algunas intervenciones quirúrgicas.

Además, las infecciones fúngicas invasivas se acompañan de elevadas morbilidad y mortalidad relacionada con el diagnóstico y tratamiento tardío¹⁻⁴. Esta elevada mortalidad 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, como ya se ha mencionado, se están desarrollando técnicas diagnósticas moleculares para la detección de patógenos fúngicos. Estas técnicas están dirigidas principalmente a los siguientes aspectos del diagnóstico micológico: a) identificación de especie mediante secuenciación de dianas taxonómicamente relevantes; b) diagnóstico clínico precoz de las infecciones fúngicas; c) detección de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos, y d) tipificación subespecífica de cepas clínicas. En los próximos apartados se desarrollarán estas 4 aplicaciones del diagnóstico molecular destacando su utilización práctica.

Ana Alastruey-Izquierdo disfruta un contrato predoctoral del FIS con el n.º de expediente FI05/00856. Isabel Cuesta y Leticia Bernal Martínez tienen un contrato de investigación de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI; MPY 1022/07_1). Algunos datos incluidos en esta revisión han sido obtenidos mediante el desarrollo de los siguientes proyectos de investigación: PI05/32 PI1279/05 del Instituto de Salud Carlos III y 1288/06 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

Correspondencia: Dr. J.L. Rodríguez Tudela.
Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III.
Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km 2.
28220 Majadahonda. Madrid. España.
Correo electrónico: jlrtudela@isciii.es

Identificación de especie mediante la secuenciación de dianas taxonómicamente relevantes

La disponibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la secuenciación de sus productos en muchos laboratorios ha permitido su aplicación para la identificación y la clasificación de los microorganismos. La identificación clásica de las levaduras y de los hongos filamentosos sigue una metodología distinta. La identificación de las levaduras se basa en la morfología y en pruebas bioquímicas similares a las empleadas en bacteriología. Por el contrario, las pruebas bioquímicas no juegan prácticamente ningún papel en la identificación de los hongos filamentosos, y ésta se basa en la observación de sus características macroscópicas y microscópicas, lo que requiere la existencia de personal muy especializado, que no es frecuente en el ámbito hospitalario.

La aparición de nuevas moléculas antifúngicas con diferentes espectros de actividad y la descripción de cepas y de especies fúngicas resistentes a estos fármacos demandan que las cepas clínicas se identifiquen a nivel de especie. No todas las infecciones fúngicas deben tratarse igual, ya que hay especies que son insensibles a algunas de las actuales alternativas terapéuticas. Por ejemplo, los *Basidiomycota* son insensibles a las cándidas y los mucorales son insensibles al voriconazol y a las cándidas⁵. Los métodos moleculares posibilitan la identificación de los hongos a nivel de especie sin la necesidad de un entrenamiento exhaustivo y específico en taxonomía clásica, especialidad bastante alejada de la práctica médica. Sin embargo, estos métodos moleculares presentan limitaciones y todavía queda tiempo hasta que puedan utilizarse de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología hospitalarios.

La primera de las limitaciones es la falta de una única diana que permita la identificación de todos los hongos causantes de micosis en humanos. La región que se emplea con mayor frecuencia como diana para detectar ADN fúngico e identificar especies es la que codifica el complejo de los ARN ribosomales (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 la clasificación de 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 detección⁶⁻⁹. Sin embargo, se ha demostrado que, para algunos géneros, esta diana no permite identificar todas las especies que lo componen, por lo que se buscan otras dianas con mayor poder de resolución. Este hallazgo complica aún más el acercamiento de estos métodos a la práctica clínica diaria, aunque las nuevas tecnologías pueden conseguir que la identificación molecular pase a ser una metodología sistemática.

Identificación de levaduras

Como ya se ha comentado más arriba, la identificación de levaduras se realiza mediante la observación morfológica y diversas pruebas bioquímicas. Varias compañías de diagnóstico han comercializado *kits* de identificación, que

muestran una gran fiabilidad para clasificar las principales especies causantes de infección en humanos. Sin embargo, han ido apareciendo nuevas especies o se han realizado reclasificaciones taxonómicas que no se pueden resolver mediante la aplicación de las técnicas fenotípicas clásicas. Por ejemplo, en los últimos años han sido reconocidos como patógenos humanos *Candida dubliniensis*¹⁰, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*⁸, *C. nivariensis* y *C. braccariensis*^{11,12} que son indistinguibles fenotípicamente de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, respectivamente. Asimismo, el género *Trichosporon* ha sufrido varias reclasificaciones tras la secuenciación del *intergenic spacer 1* (IGS1)¹³. Estos y otros hallazgos han propiciado el desarrollo de la identificación molecular mediante secuenciación, aunque todavía no ha alcanzado los laboratorios asistenciales. Las dianas más frecuentemente empleadas para identificar las levaduras han sido la región D1/D2 del 28S ADNr y los *internal transcribed spacer* (ITS) 1 y 2 del ADNr. La aplicación de este sistema de identificación ha causado la desaparición de *T. beigeli*, el cual se ha desligado en al menos 18 especies nuevas. En la figura 1 se puede ver un ejemplo de identificación de especies de levaduras tras la secuenciación del fragmento ITS 1 y 2. Como se puede observar, la identificación es indiscutible incluso para especies fenotípicamente idénticas. Sin embargo, hay varias especies que no se clasifican correctamente con este sistema, lo que obligaría a secuenciar una segunda diana, complicando su utilización sistemática.

Identificación de hongos filamentosos

La identificación morfológica de los hongos filamentosos tiene 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. Al ser un proceso lento que necesita de expertos entrenados en esta disciplina, es una especialidad al alcance de unos pocos centros de referencia y con escasa utilidad clínica¹⁴. Al igual que se ha descrito para las levaduras, la disponibilidad de las técnicas moleculares ha propiciado reclasificaciones taxonómicas¹⁵⁻¹⁷, además de revelar que especies fenotípicamente idénticas son molecularmente diferentes^{6,7,18-21}. Sin embargo, para los hongos filamentosos, la secuenciación de los ITS resuelve menos especies que en el caso de las levaduras. Por ejemplo, para *Aspergillus* y *Scedosporium* hay que secuenciar el gen de la beta-tubulina^{18,20,21} y para *Fusarium* el gen que codifica para el factor de elongación alfa⁷. En la figura 2 se puede consultar la resolución de diferentes especies patógenas humanas tras la secuenciación de los ITS.

En resumen, y por el momento, la identificación molecular sigue circunscrita a los laboratorios de referencia. 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 saber 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 IGS1, que es la única forma de distinguir las especies que son resistentes a anfotericina B de las que son sensibles¹³.

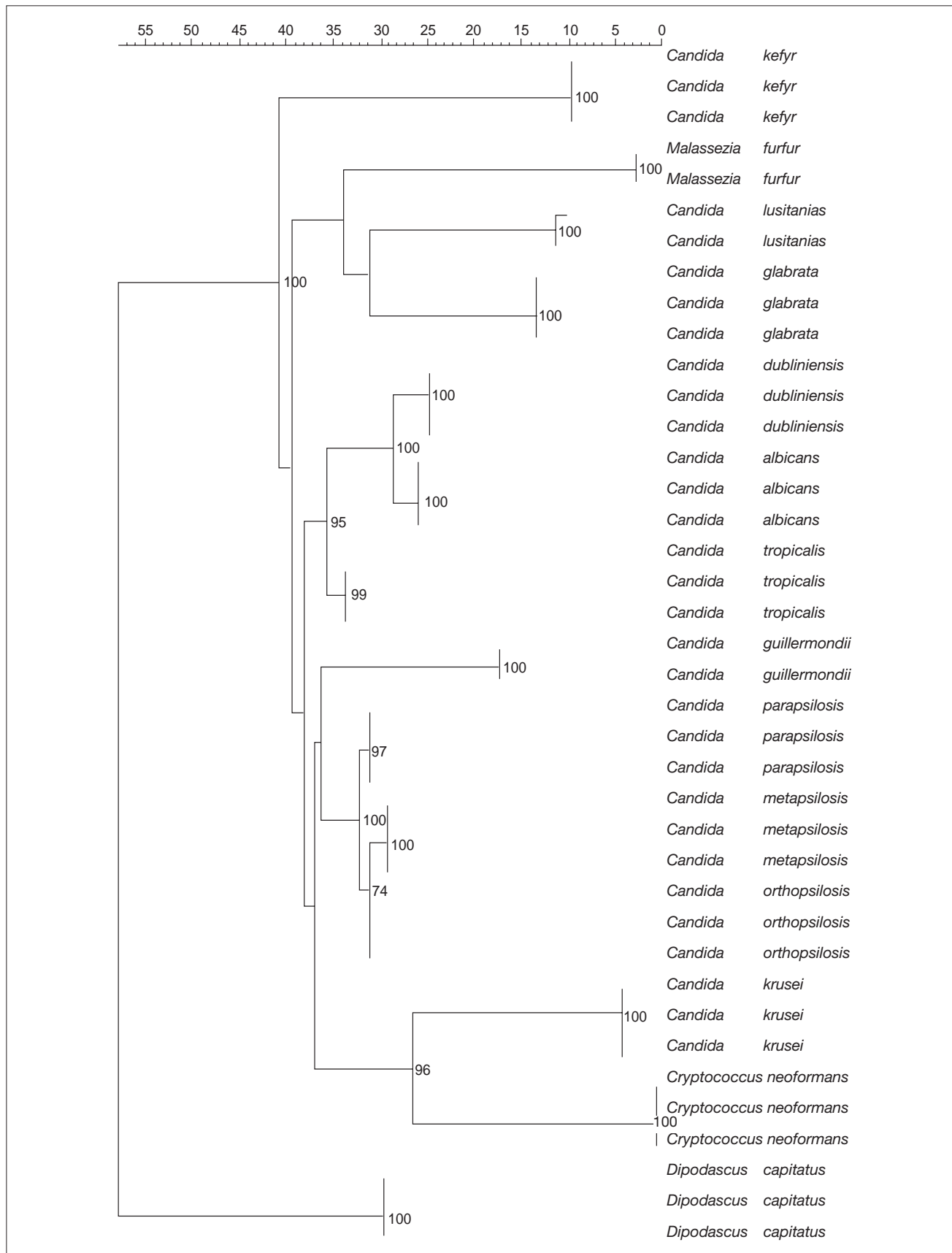


Figura 1. Identificación de levaduras mediante la secuenciación del ITS (*internal transcribed spacer*). El árbol se ha producido mediante *Neighbour joining* con un *bootstrap* de 2000.

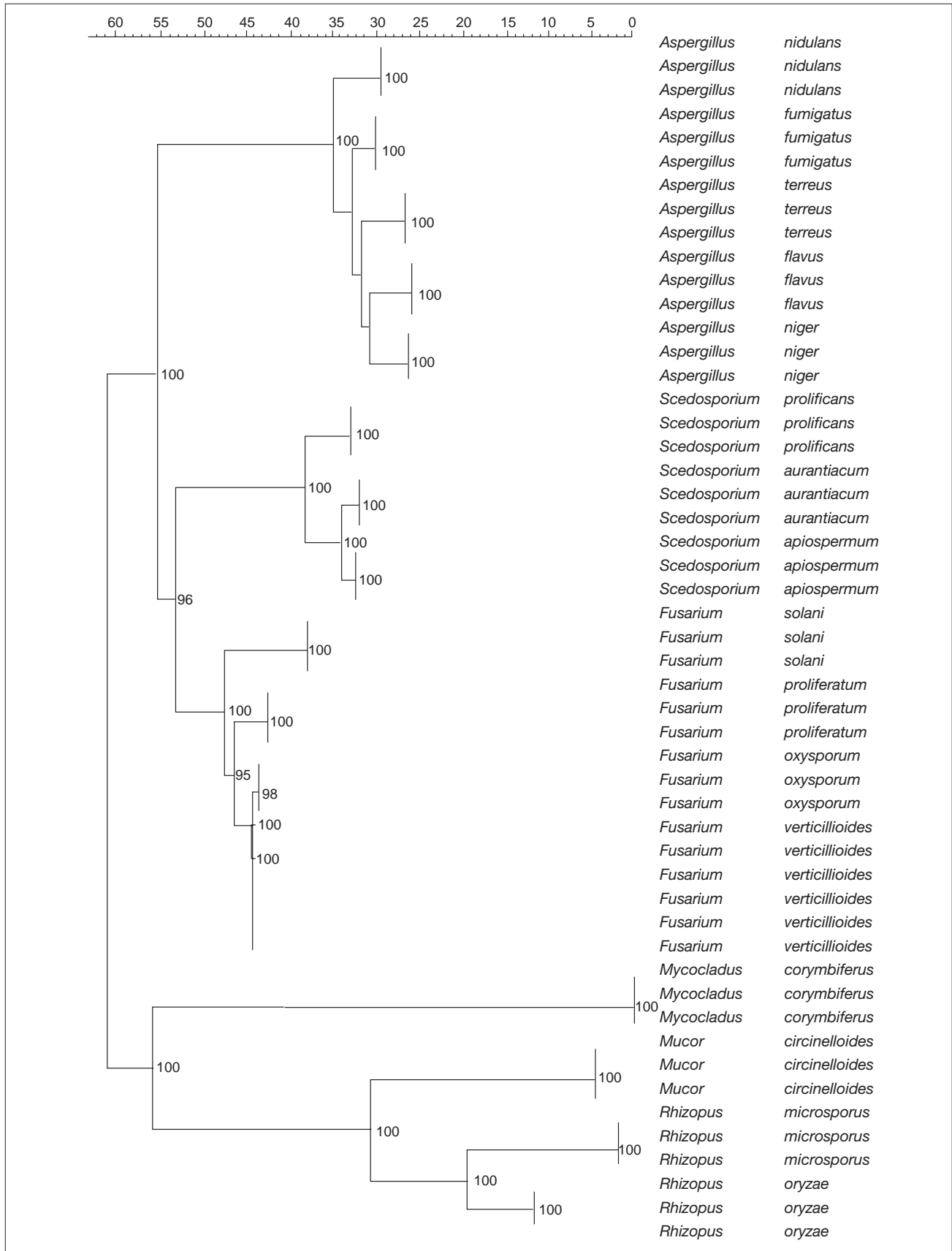


Figura 2. Identificación de hongos filamentosos mediante la secuenciación del ITS (*internal transcribed spacer*). El árbol se ha producido mediante *Neighbour joining* con un *bootstrap* de 2000.

Para finalizar, debe enfatizarse que la identificación molecular se convertirá en la técnica de referencia en un futuro próximo. La difusión y estandarización que se está realizando hoy en 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, acercando la identificación molecular a la práctica clínica diaria²².

Diagnóstico clínico precoz de las infecciones fúngicas

Una de las causas principales de la elevada mortalidad de las infecciones fúngicas invasivas es el retraso en el diagnóstico de la infección. Por ello, se han desarrollado técnicas de diagnóstico precoz que se basan en la detección de componentes fúngicos¹⁴ como, por ejemplo, el antígeno de *Cryptococcus*, el galactomanano de *Aspergillus*, el manano de *Candida* o el beta-glucano, que es un componente presente en numerosos hongos patógenos humanos. 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 hematológicos con riesgo alto de aspergilosis, tanto en suero como, según trabajos recientes, en lavado broncoalveolar¹⁴. Además de la detección antigénica, se están desarrollando técnicas de detección de ácidos nucleicos, cuya rentabilidad es discreta. No obstante, algunas de éstas empiezan a abrirse camino entre los métodos de diagnóstico clínico.

La mayor parte de los métodos de detección de ácidos nucleicos utilizan la amplificación del ADN mediante PCR y se han desarrollado para diagnosticar la aspergilosis, la micosis más frecuente y con mayor mortalidad en algunos grupos de enfermos inmunodeprimidos^{14,23}. En términos generales, esta PCR diagnóstica tiene una rentabilidad dudosa y debe considerarse como una técnica complementaria en fase de desarrollo. Hay que destacar la falta de estandarización de esta técnica, ya que cada laboratorio utiliza aproximaciones diferentes en cuanto a modo de extracción del ADN, región que hay que amplificar, sondas, cebadores, condiciones de la PCR y cuantificación. El único acuerdo generalizado es que se debe emplear PCR cuantitativa, ya que, además de distinguir entre colonizaciones e infecciones, posiblemente pueda utilizarse para el seguimiento de la respuesta al tratamiento. A pesar de estas limitaciones, hay *kits* comerciales, como el denominado SeptiFast (Roche Diagnostics), y otros que han visto la luz 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 es de evidente utilidad para muchos enfermos²⁴.

La inmensa mayoría de las técnicas de PCR diagnóstica de la aspergilosis tienen como diana alguna zona del fragmento 18S del ADN ribosómico, cuya especificidad es discutible, por lo que otros grupos están utilizando como

diana los ITS u otras zonas genómicas. También se está planteando la posibilidad de que las determinaciones con la PCR se realicen de forma seriada, como se recomienda con las determinaciones de galactomanano, aunque todavía no hay suficientes datos clínicos que permitan recomendar esta estrategia diagnóstica²⁵.

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 enfermos 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%²⁶. Si estas cifras se confirman con un mayor número de enfermos, podría considerarse un método útil desde el punto de vista asistencial. Otras técnicas, desarrolladas para detectar patógenos emergentes como mucorales, *Trichosporon*, *Fusarium*, etc., no se han evaluado en profundidad^{9,27}.

Donde las técnicas de detección basadas en la PCR han demostrado una mayor utilidad ha sido en la detección de *Pneumocystis jirovecii* y de los patógenos causantes 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 que codifican glucoproteínas de superficie. La mayoría de los estudios han obtenido altas sensibilidad y especificidad 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 potencial diferenciación entre ambos tipos de sujetos. Asimismo, en un estudio prospectivo, esta técnica se ha empleado para el diagnóstico de la neumonía por *P. jirovecii*^{28,29}.

En cuanto a las micosis endémicas, histoplasmosis, blastomicosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis y penicilliosis, hay pruebas que detectan anticuerpos frente a todas ellas, pero su utilidad es limitada, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. 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 los Estados Unidos. Por ello, se han desarrollado técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real para el diagnóstico de la histoplasmosis³⁰. 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 fue superior en muestras respiratorias (100% de sensibilidad), mientras que en suero, el ADN sólo se detectó en el 70% de los casos. La especificidad de la técnica fue total, del 100%³¹.

Para las otras micosis endémicas hay menos datos. En el caso de la paracoccidioidomicosis, hay pruebas con alta sensibilidad como la detección de anticuerpos y antígenos en suero de pacientes infectados, que además es útil para el seguimiento de la enfermedad y su respuesta al tratamiento³². Recientemente se han publicado datos acerca de técnicas de PCR que permiten diagnosticar la infección de muestras tomadas en lesiones cutáneas y mucosas³³.

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 para 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 para la diana de los azoles, la 14-alfa lanosterol demetilasa, se han relacionado con la 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 son las mutaciones puntuales en el gen, que pueden detectarse en cepas y muestras clínicas mediante técnicas de PCR³⁴⁻³⁶.

Otro mecanismo, quizá el que se detecta con mayor frecuencia en cepas clínicas de levaduras, es la reducción de las concentraciones intracelulares de los azoles, que suele deberse a un aumento en la expresión de los genes que codifican para las bombas de expulsión. Hay 2 tipos principales, transportadores ABC (*ATP binding cassette*) y los MFS (*major facilitators superfamily*) y pueden detectarse mutaciones en los genes que los codifican, que conllevarían un aumento de expresión de las bombas³⁷.

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 múltiple³⁸.

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

La tipificación molecular se ha convertido en una herramienta imprescindible para conocer la cadena de infección y diseñar estrategias eficaces para prevenir y disminuir la incidencia de las enfermedades infecciosas³⁹. En el campo de la micología se han empleado diversas técnicas de tipificación. Estos métodos se suelen aplicar para analizar brotes de infección intrahospitalaria y en estudios de genética poblacional^{40,41}. Se han empleado, entre otras, análisis de isoenzimas, diferentes métodos de RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) y técnicas basadas en la PCR, como la de RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*), el SSDP (*sequence-specific DNA primers*) o el PMM (*polymorphic microsatellite markers*). Algunas discriminan sólo entre subespecies, pero otras son capaces de distinguir entre cepas individuales³⁹. Recientemente se ha desarrollado un método basado en la secuenciación de varias dianas, denominado

MLST (*multilocus sequencing typing*). Este enfoque se está utilizando en la actualidad para analizar poblaciones de *Candida* spp.⁴¹.

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 quirófanos⁴². En otros medios, como las salas con enfermos 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^{43,44}. Por último, en caso de que se produzca un brote de micosis invasivas 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

- Almirante B, Rodríguez 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.
- Ascioglu S, Rex J, de Pauw B, Bennett J, 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.
- Garey K, Rege M, Pai M, Mingo D, Suda K, Turpin R, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis*. 2006;43:25-31.
- Gavaldà J, Len O, San Juan R, Aguado Jm, Fortun J, Lumbres C, et al. Risk Factors For Invasive Aspergillosis In Solid-Organ Transplant Recipients: A Case-Control Study. *Clin Infect Dis*. 2005;41:52-9.
- Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Mellado E, Buitrago M, Monzón A, Rodríguez-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.
- Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Rodríguez-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.
- Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:805-9.
- Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-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.
- 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.
- Díaz-Guerra T, Mellado E, Cuenca Estrella M, Laguna F, Rodríguez-Tudela JL. Molecular characterization by PCR-fingerprinting of *Candida dubliniensis* strains isolated from two HIV-positive patients in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999;35:113-9.
- Bishop J, Chase N, Magill S, Kurtzman C, Fiandaca M, Merz W. *Candida* bracarensis detected among isolates of *Candida glabrata* by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization: susceptibility data and documentation of presumed infection. *J Clin Microbiol*. 2008;46:443-6.

12. Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J Clin Microbiol*. 2008;46:933-8.
13. Rodríguez-Tudela JL, Díaz-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.
14. Gadea I, Cuenca-Estrella M. Recomendaciones para el diagnóstico micológico y los estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:32-9.
15. Hoffmann K, Discher S, Voigt K. Revision of the genus *Absidia* (mucorales, zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladaceae* fam. nov. *Mycological Research*. 2007;111:1169-83.
16. Ohst T, de Hoog S, Presber W, Stavrakieva V, Graser Y. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* clade (dermatophytes). *J Clin Microbiol*. 2004;42:4444-8.
17. Kaszubiak A, Klein S, de Hoog GS, Grasser Y. Population structure and evolutionary origins of *Microsporium canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii* Infection. *Genetics and Evolution*. 2004;4:179-86.
18. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1244-51.
19. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2005;4:625-32.
20. Gilgado F, Cano J, Gene J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4930-42.
21. Gilgado F, Cano J, Gene J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol*. 2008;46:766-71.
22. Loy A, Bodrossy L. Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin Chim Acta*. 2006;363:106-19.
23. Buitrago MJ, Gómez-López A, Mellado E, Rodríguez-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.
24. Donnelly JP. Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go. *Clin Infect Dis*. 2006;42:487-9.
25. Gómez-López A, Martín-Gómez MT, Martín-Dávila P, López-Onrubia P, Galvada J, Fortún 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.
26. 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.
27. Osorio S, de la Cr, Monteserin MC, Granados R, Ona F, Rodríguez-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.
28. 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.
29. 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.
30. Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodríguez-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.
31. Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-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.
32. Marques da Silva SH, Queiroz-Telles F, Colombo AL, Blotta MH, Lopes JD, Pires DC. Monitoring Gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2419-24.
33. 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.
34. 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.
35. Garcia-Effron G, Dilger A, Alcázar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS. Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1200-6.
36. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-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.
37. Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Micheli M, Bille J. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. *Drug Resist Update*. 1998;1:255-65.
38. 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.
39. Cuenca-Estrella M, Mellado E. [Are molecular techniques useful in aspergillosis surveillance and control]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21:469-71.
40. Galhardo MC, de Oliveira RM, Valle AC, Paes RA, Silvatavares PM, Monzón 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.
41. Odds FC, Bounoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, et al. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2007;6:1041-52.
42. Díaz-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.
43. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Prieto E, Díaz-Guerra TM, García-Cía 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.
44. Mellado E, Díaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Buendía V, Aspa J, Prieto E, et al. Characterization of a possible nosocomial aspergillosis outbreak. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:543-8.