

José Carlos Palomares
Manuel Cuenca Estrella
Consuelo Ferrer
M^a Francisca Colom

20.1. Introducción

Las denominadas técnicas moleculares de diagnóstico se están incorporando al espectro de herramientas propias de la microbiología clínica, en primer lugar como una opción que salva las dificultades de detección de microorganismos no cultivables o de difícil/lento desarrollo "in vitro", pero además, con la ventaja frente a las técnicas basadas en el cultivo, de la mayor rapidez de obtención de resultados.

Puede considerarse que el trabajo diagnóstico con microorganismos está definido en dos ámbitos diferentes que manejan conceptos y herramientas distintos: el celular y el molecular. La microscopía y el cultivo son las herramientas fundamentales en el nivel celular. Ambas continúan siendo los pilares fundamentales del diagnóstico microbiológico y son casi las únicas estandarizadas en Micología. Tras el extenso desarrollo de la bioquímica y el nacimiento de la Inmunología en el pasado siglo XX, aparece la posibilidad de utilizar el ámbito molecular como un nuevo dominio para el diseño de herramientas y estrategias de diagnóstico. La inmunología se convirtió en una inagotable fuente de recursos para la elaboración de nuevas técnicas diagnósticas, muchas de las cuales están estandarizadas y son métodos de referencia para diagnóstico. Después del manejo de anticuerpos y otras grandes moléculas implicadas en inmunología, el abordaje del estudio de los ácidos nucleicos ha sido el segundo ámbito de estudio molecular que ofrece interesantes perspectivas para el desarrollo de métodos de diagnóstico. Como sucedió en su día con las técnicas inmunológicas, existen muchas expectativas con respecto a estos métodos. Hasta el momento sólo algunos protocolos de trabajo están estandarizados pero hay un gran número de propuestas pendientes de la adecuada consolidación que se espera aporten soluciones a problemas de creciente interés, como el diagnóstico precoz de la infección fúngica invasora (IFI) en individuos inmunodeprimidos.

El diagnóstico molecular se basa principalmente en dos grandes pilares: la hibridación de los ácidos nucleicos y los métodos de amplificación de los mismos. Estos métodos permiten aumentar la sensibilidad y la rapidez de la detección fúngica y, además, identificar al patógeno sin necesidad de cultivarlo.

Las técnicas de biología molecular basadas en detección de ácidos nucleicos, a diferencia de las inmunológicas, están escasamente implantadas en los laboratorios de microbiología en general, por lo que se dispone de pocos protocolos estandarizados con el aval de un uso amplio y contrastado. No obstante, algunas técnicas van consolidándose para su aplicación en el diagnóstico de rutina y, otras, para estudios más especializados propios de laboratorios de referencia.

Además, una clara ventaja de los métodos de detección de ácidos nucleicos frente al cultivo, es la posibilidad de detección de patógenos en muestras de pacientes que están recibiendo terapia antifúngica ya que la viabilidad del hongo no es imprescindible para el diagnóstico aunque, obviamente, puede haber disminuido la carga fúngica en la muestra por efecto del tratamiento recibido.

Los contenidos de este capítulo se han elaborado para dar respuesta a cuestiones importantes, algunas de las cuales no están definitivamente resueltas, por ejemplo: ¿qué muestras son las que ofrecen un mejor rendimiento para la detección del ADN fúngico?, ¿qué secuencia debe elegirse para su uso en el diagnóstico rutinario?, ¿cuál es el método óptimo para extraer el ADN? y ¿qué métodos de amplificación y detección son los mejores? En los siguientes apartados se intenta contestar estas dudas, ofreciendo un texto que pueda servir como punto de partida a aquellos microbiólogos que empiezan a interesarse por las herramientas de diagnóstico molecular no inmunológicas.

20.2. Manejo de muestras para la detección de ácidos nucleicos fúngicos

Como en otros procedimientos de diagnóstico microbiológico, es necesario obtener las muestras de forma apropiada, siguiendo las normas generales de asepsia y transporte rápido al laboratorio.

Cuando se plantea aplicar técnicas de amplificación de ácidos nucleicos es especialmente importante ser muy cuidadoso con la asepsia. La mayoría de estos métodos tienen una alta sensibilidad y son capaces de detectar cantidades muy pequeñas de ADN fúngico, por lo que una dosis contaminante, aunque sea muy baja, puede ofrecer un resultado positivo claro. Este aspecto es de importancia extrema cuando se llevan a cabo métodos basados en la amplificación de secuencias universales para hongos.

De forma general, se recomienda no manipular las muestras en el mismo laboratorio en el que se trabaja con cultivos fúngicos. Además, si es posible, el termociclador (aparato que realiza la amplificación) debe estar situado en una habitación o cubículo independiente del resto del laboratorio y sin sistema de ventilación que genere corrientes de aire.

Para el diagnóstico de las infecciones fúngicas, se puede utilizar prácticamente cualquier tipo de muestra clínica, desde líquidos orgánicos a tejidos. Las muestras que han sido más ensayadas, hasta el momento, son la sangre y el suero; aunque se dispone de interesantes resultados con casi cualquier fluido primariamente estéril, como líquido cefalorraquídeo, humor acuoso y vítreo, líquidos de derrames, lavado broncoalveolar y diversos tejidos [1-6].

Las posibilidades de los métodos son en principio muy amplias pero sin duda, el diagnóstico precoz de IFI es el objetivo de mayor interés y en el que se han puesto más expectativas en la aplicación de estas técnicas. En estos casos la muestra más estudiada ha sido la sangre total y los patógenos de mayor interés *Candida* y *Aspergillus* [7,8].

20.2.1. Peculiaridades en el manejo de determinadas muestras

Suero. Aunque la sangre en principio es mejor muestra que el suero o plasma, los primeros protocolos aplicados para la extracción de ADN de estas muestras ofrecían un bajo rendimiento, en gran medida debido a la dificultad para romper las células fúngicas y extraer con éxito suficiente cantidad de molécula diana, además la presencia de hemoglobina puede inhibir la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así pues, se consideró que la utilización de suero como sustrato, ofrecería mejor rendimiento ya que en el mismo se podrían detectar fragmentos libres de moléculas de ácidos nucleicos. Algunos estudios han ofrecido resultados positivos en este sentido [9,10] pero actualmente, los problemas planteados con la sangre total se van solucionando y es minoritario el empleo de suero como sustrato de estudio para detección de ácidos nucleicos. De hecho este método tiene un bajo rendimiento

ya que el ácido nucleico libre se degrada rápidamente y la concentración de estas moléculas es siempre más baja que en sangre total.

Sangre. En ella se pueden encontrar estructuras celulares fúngicas completas en las que el hongo se conserva con su genoma intacto. La presencia de los envoltorios celulares propios de los hongos generó, al comienzo, muchos problemas para conseguir la extracción del ADN, pero estas limitaciones se han ido resolviendo y, actualmente, el problema que genera la sangre total depende sobre todo de los componentes que interfieren con la PCR. Por tanto, es conveniente tratar la sangre (lisando los hematíes) antes de procesarla para extracción de ácidos nucleicos.

Otros fluidos estériles. Los fluidos primariamente estériles como líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido pleural, líquido ascítico, humor acuoso, humor vítreo y otros, no suelen precisar tratamiento antes de la extracción de ácidos nucleicos. En caso de que sean líquidos hemorrágicos hay que hacer una lisis previa de hematíes. Las células de la serie blanca, muy abundantes en líquidos purulentos, pueden contener elementos fúngicos en su interior y son muy útiles por conservar la molécula diana. Estas células se lisarán durante el proceso de extracción del ADN.

Muestras oculares. Las muestras de endoftalmítis y queratitis deben ser tomadas en condiciones estériles y preferiblemente por el oftalmólogo. En endoftalmítis, el medio extracelular debe esterilizarse con solución yodada de povidona 5% antes de la extracción de la muestra. Siempre es preferible dejar el fluido extraído (vítreo o acuoso) en la jeringuilla, transportarla al laboratorio a 4°C y procesarla inmediatamente en un ambiente estéril. En las queratitis se realiza un raspado con espátula de Kimura, después de instilar anestésico tópico, y las células se depositan en agua destilada estéril que se trabajará como muestra [3].

Muestras tisulares. Las biopsias tienen una buena rentabilidad, aunque para conseguir las deben realizarse técnicas invasoras no indicadas en todos los enfermos. Es importante manejarlas como muestras de diagnóstico molecular desde el momento en que se extraen del paciente, ya que el tratamiento habitual de las mismas con fijadores como el formol, las invalida como material de trabajo para las principales técnicas de diagnóstico molecular.

Lavado broncoalveolar. Las muestras respiratorias tienen una especificidad menor, debido a los falsos positivos que genera la presencia de *Aspergillus*, y otras especies fúngicas, que colonizan el tracto respiratorio. En el caso de utilizar lavados broncoalveolares, muestras presuntamente estériles, la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo y negativo son superiores a los de otras muestras, según han demostrado algunos estudios [11,12].

20.3. Técnicas de extracción

La preparación de la muestra puede tener un impacto muy significativo en la sensibilidad y reproducibilidad del método diagnóstico. En general, el método de preparación de la muestra debe liberar el ADN intracelular, rompiendo la pared de la célula fúngica, la membrana celular y la membrana nuclear. Además, debe concentrar las moléculas *blanco* del ADN que puedan estar presentes en pequeñas cantidades y debe eliminar los restos de proteínas, contaminantes, posibles inhibidores y otros materiales extraños, sin que se degrade el ácido nucleico [13].

Existe una gran diversidad de protocolos individualizados y técnicas *caseras* de extracción. Las divergencias entre ellos se centran fundamentalmente en el método de ruptura de envoltorios. Todos los hongos no presentan las mismas necesidades en este sentido, de forma que algunos se lisan de manera sencilla con un choque osmótico y detergentes, mientras que otros precisan de la combinación de varias estrategias para poder exponer el genoma. En general, los mecanismos de ruptura y lisis de pared y membranas pueden ser de tres tipos: mecánico, osmótico y enzimático o bioquímico, pudiéndose combinar entre ellos.

A pesar de tanta variedad, existen protocolos ya estandarizados de uso muy frecuente para un amplio número de especies fúngicas. Entre los protocolos de extracción comercializados, Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratorios, CA, EE.UU.) y QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, CA, EE.UU.) son fiables pero su precio es elevado; entre los protocolos de extracción caseros, el publicado por White y col. es uno de los que presenta mayores garantías [14].

En caso de no disponer de un protocolo estandarizado, algunos detalles prácticos pueden ayudar a elegir entre los disponibles. Un aspecto importante es el **tipo de muestra** (con o sin inhibidores) y la **cantidad** de que se dispone de la misma. En general los métodos de biología molecular no precisan de grandes cantidades de muestra, de hecho es otra de las ventajas de estas técnicas, pero en ocasiones hay que tenerlo en cuenta (muestras oculares) para elegir métodos con alto rendimiento [3]. Por otra parte, es muy importante valorar la **presencia de la diana** que se va a tratar de detectar. Algunos métodos de extracción suponen una gran pérdida del ADN, o una dilución sustancial de este, durante el procesado de la muestra. Cuando la técnica elegida incluye la amplificación de la diana, el problema es menor que si se han elegido técnicas de hibridación u otras que no multiplican la secuencia a detectar. Las dianas que están presentes en un alto número de copias a lo largo del genoma del hongo originan menos problemas en este sentido. Si

además se utilizan técnicas de amplificación de las mismas, el efecto de pérdida de ADN asociado a la extracción es menor. Por último, y muy importante, es imprescindible tener en cuenta las peculiaridades del hongo a detectar, especialmente la posible **presencia de envoltorios** u otras estructuras celulares que limiten la efectividad de la extracción (como la presencia de una gruesa cápsula). Muchos de los primeros fracasos en la aplicación de estos métodos en micología, se debieron a la dificultad que presentan la mayoría de los hongos para la ruptura de sus envoltorios. Algunos protocolos de extracción precisan combinar más de un método de lisis celular, para garantizar esta ruptura. Además, con una determinada muestra es posible que un protocolo permita extraer ADN de una levadura como *Candida* pero no de otra como *Cryptococcus*. El protocolo a seguir se puede perfilar muy bien cuando existe una clara sospecha diagnóstica, pero cuando se quiere extraer ADN de cualquier hongo que pueda estar parasitando un determinado tejido el problema es más complejo.

Por lo tanto, la eficacia diagnóstica de los distintos métodos moleculares dependerá en gran medida de la técnica de extracción utilizada. En términos generales, los métodos de extracción deben seguir protocolos universales y, si es posible, deben estar comercializados. Además, se debe intentar mejorar su capacidad de concentración y purificación de los ácidos nucleicos mediante procesos de automatización o mediante tratamientos específicos (sonicación, congelación, etc.).

Así pues, cuando no existe un protocolo estandarizado es necesario valorar una serie de requisitos:

- **Tipo de muestra:** con o sin posibles inhibidores de la polimerasa.
- **Cantidad de muestra:** en general se precisan cantidades bajas.
- **Diana a detectar:** De bajo o alto número de copias en el genoma.
- **Envoltorios celulares:** Presencia de cápsula u otros.

Habitualmente, la ruptura de los envoltorios celulares fúngicos se realiza mediante diferentes métodos:

- **Mecánicos:** sonicación, congelación, agitación con perlas de vidrio o "tips".
- **Químicos:** detergentes o agentes químicos (urea, SDS).
- **Enzimáticos:** proteinasa K, novozima, zimolasa.

Además de la ruptura de la pared y otras estructuras, todos los protocolos deben incluir agentes que precipiten y "limpien" de restos celulares la muestra. Para ello lo más frecuente, es aplicar la denominada "extracción fenólica" que, después del sistema que corresponda de ruptura de envoltorios, permite obtener una muestra de ácido nucleico limpia y en cantidad suficiente.

Un consejo...

- Para garantizar un buen resultado en la técnica de amplificación de ADN de la muestra, es importante que esta sea lo más limpia posible, de modo que, en la medida que se pueda, se debe eliminar todo material acompañante que no esté relacionado con el genoma fúngico que se quiere detectar. Si la muestra presenta muchos restos celulares (aparece una interfase sucia durante la fenolización), se debe repetir la extracción fenólica. Esto produce una pérdida de ADN en cada procesado, pero es preferible menos cantidad de ADN y que este esté limpio a mayor concentración de ADN pero con inhibidores en la muestra.

En la **Tabla 20.1** se exponen los resultados de un estudio recientemente publicado [15] que analiza algunos de los métodos utilizados en la extracción de ADN a partir de *Candida* (proteínasa K-fenol-cloroformo -PKFC-; Lisis por calor y tiocianato de guanidinio -LCTG-; QIAmp DNA; HighPure PCR template y DNAzol). Estos resultados muestran una amplia variación en los límites de detección, el tiempo de procesamiento y el coste, en función del protocolo de extracción utilizado.

20.4. Selección de la molécula diana

Las moléculas utilizadas como blanco de detección en las pruebas desarrolladas para el diagnóstico de las micosis incluyen tanto genes mitocondriales como nucleares, de una o múltiples copias (**Tablas 20.2, 20.3, 20.4 y 20.5**) [13]. En general, los métodos diagnóstico moleculares que utilizan genes multicopia ofrecen mejores resultados que aquellos que emplean genes con una sola copia. La diana multicopia más utilizada son los genes

ribosómicos. De un modo práctico, pueden considerarse las dianas ribosómicas y las no ribosómicas como dos categorías diferenciadas para valorar los distintos métodos de detección de hongos.

20.4.1 Dianas no ribosómicas

Entre las dianas no ribosómicas se incluyen las secuencias que codifican a) proteínas de tipo funcional, como el citocromo P450 de *Candida* [16], implicadas en funciones vitales para el género o la especie o en funciones características del grupo y b) proteínas de tipo estructural (gen de la actina o proteínas del ribosoma) [17]. También se han utilizado como dianas secuencias que amplifican telómeros de genes mitocondriales [18] y secuencias no específicas y arbitrarias que se utilizan para hibridación y amplificación al azar por PCR (AP-PCR) [19].

20.4.2 Dianas ribosómicas

La región genómica más frecuentemente utilizada para detectar ADN fúngico e identificar especies, es la que incluye el complejo ribosomal (genes 18S, 5.8S y 28S). Estos genes contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos y también, dominios variables y regiones espaciadoras internas (ITS), altamente variables. Las secuencias conservadas se pueden utilizar para detectar la infección fúngica, mientras que las variables se pueden emplear para la identificación de las especies implicadas. Esta región además, se encuentra en el genoma en un alto número de copias. En levaduras concretamente, se estiman unas 150 repeticiones en tandem de los genes ribosómicos [20] lo que garantiza la sensibilidad del método de detección. De hecho, se han obtenido magníficos resultados en este sentido con dichas secuencias

Tabla 20.1. Comparación entre distintos métodos de extracción de ADN en sangre inoculada con *Candida*.

Método	Rango de Pureza ADN*	Límite de detección (UFC/ml)**	Tiempo (h)***	Costo/muestra (€)
PKFC	1,13 (1,12-1,6)	1.000	2,75	0,6
LCTG	1,75 (1,3-1,8)	10	2,50	0,5
QIAmp DNA	1,66 (1,02-1,7)	10	0,5	3,8
HighPure PCR	1,02 (1,0-1,12)	100	0,75	5,5
DNAzol	1,02 (0,96-1,1)	10.000	1	1,7

* La pureza media del ADN se determinó mediante espectrofotometría.

** El límite de detección fue el número mínimo de UFCs, con el que se detectó una señal positiva de PCR en 5 repeticiones.

***Tiempo medio de extracción de ADN en seis muestras distintas.

Tabla 20.2. Genes empleados para la detección de fungemia por *Candida* y/o evidencia histopatológica de candidiasis.

Gen	Método	°C de hibridación*	Nº de ciclos*	Detección	Muestra	Nº positivos / Nº pacientes (%)	
						Pacientes candidiasis invasiva	Controles
Actina	PCRe	55	30	Hibridación sonda radioactiva	Suero	11/14 (78'6)	0/29 (0)
Sintetasa quitina	PCRe	54	30	Southern blotting	Sangre	15/16 (93'4)	0/34 (0)
P450	PCRa	55/45	35/35	Bromuro Etidio	Suero	16/18 (88'9)	0/6 (0)
ITS	PCRe	55	40	Enzimoimmunoanálisis	Suero	28/28 (100)	3/31 (9'7)
18S ARNr	PCRe	62	35	Southern blotting	Sangre	8/8 (100)	3/100 (3)
P450	PCRe	59	40	Restricción con endonucleasas	Sangre	13/14 (92'9)	18/58 (31)

PCRe: PCR estándar; PCRa: PCR anidada.
 *: Valores de temperatura de hibridación y número de ciclos de la primera y segunda PCR.

Tabla 20.3. Detección de ácidos nucleicos en pacientes con histología y/o aspergilosis invasora probada.

Gen	Método	°C de hibridación*	Nº de ciclos*	Detección	Muestra	Nº positivos / Nº pacientes (%)	
						Pacientes aspergilosis probada	Controles**
Proteasa alcalina	PCRe	63	42	BrEt/S.B.	BAL	4/4 (100)	6/46 (13)
26S ITS	PCRe	56	32	BrEt/S.B.	Respiratorias	3/3 (100)	4/17 (23,5)
18S ADNr	PCRe	62	40	BrEt/S.B.	BAL	4/4 (100)	0/14 (0)
Mitocondrial	PCRc	60	40	BrEt/Hib.	BAL	3/3 (100)	12/49 (24,5)
18S ADNr	PCRa	50/65	30/30	BrEt/S.B.	Suero	14/20 (70)	0/20 (0)
Micocondrial	PCRc	55	45	ELISA	BAL	2/6 (33.3)	0/19 (0)
Mitocondrial	PCRe	58	40	ELISA	BAL	3/3 (100)	0/57 (0)
18S ADNr	PCRa	50/65	30/30	BrEt	Suero	4/4 (100)	ND
18S ADNr	PCRe	62	35	ELISA	Sangre	7/7 (100)	0/10 (0)
18S ADNr	PCRa	57/60	40/30	BrEt	Suero	4/4 (100)	ND
18S ADNr	PCRa	65/65	23/35	BrEt	Sangre	6/6 (100)	1/188 (0,53)
18S ADNr	PCRa	65/65	23/35	BrEt	BAL	6/6 (100)	4/188 (2,1)
ARNr grande	PCRa	58/58	31/31	BrEt	Suero	6/6 (100)	4/19 (21,1)
28S ADNr	PCR	60	45	Fluorescencia	Suero	6/6 (100)	0/39 (0)
ARNt	PCR	60	40	FRET	Sangre	6/7 (86)	4/50 (8)

PCRe: PCR estándar; PCRa: PCR anidada; PCRc: PCR competitiva; BAL: Lavado broncoalveolar; BrEt: tinción con bromuro de etidio; S.B.: Southern blotting; ELISA: Enzimo Inmunoanálisis; ND: no determinado.
 *: Valores de temperatura de hibridación y número de ciclos de la primera y segunda PCR.
 **: Incluye personas sanas y/o pacientes colonizados y/o pacientes con otras infecciones.

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8

ribosómicas [3,21,22]. La organización de este complejo en los hongos, representada en la **Figura 20.1**, permite diseñar sondas y cebadores que hibriden y detecten tanto secuencias muy conservadas e inespecíficas, como variables y muy específicas, dependiendo del objetivo del método.

Gen de la subunidad 18S. Los primeros estudios que utilizaron el complejo ribosomal como diana, se concentraron en el gen 18S del ADN. La comparación de las secuencias nucleotídicas dentro de esta región ha sido un método muy útil para taxonomía de base filogenética. Sin embargo, su uso en

Tabla 20.4. Marcadores moleculares utilizados en la detección de criptococosis y otras micosis endémicas.

Organismo	Método	Detección	Blanco amplificación	Tamaño amplicón (pb)	°C de hibridación*	Nº ciclos
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	PCRe	Sonda	28S ADNr	315	50	50
	PCRe	BrEt-FCES	ITS		55	30
<i>Coccidioides immitis</i>	PCRe	Sonda	28S ADNr	200	50	50
<i>Cryptococcus neoformans</i>	PCRa	BrEt	ADNr	183	66	31
	PCRe	Sonda	28S ADNr	197	50	50
	PCRe	SSPC	18S ARNr	343	55	31
	PCRe	S.B.	18S ADNr	345	62	50
	PCRa	S.B.	Gen URA5	345 y 236	63	36
	PCRa	BrEt	ITS	415	55/55	20/30
	PCRe	BrEt-FCES	ITS	315	55	30
<i>Histoplasma capsulatum</i>	PCRe	Sonda	28S ADNr	299	50	50
	PCRe	BrEt-FCES	ITS		55	30
<i>Penicillium marneffei</i>	PCRe	BrEt-FCES	ITS	280-283	55	30
<i>Paracoccidioides</i> spp.	PCRe	Sonda	28S ARNr	220	55	38

PCRe: PCR estándar; PCRa: PCR anidada; BrEt: tinción con bromuro de etidio; S.B.: Southern blotting; FCES: Sistema electroforesis capilar fluorescente; SSCP: Polimorfismo conformación cadena sencilla.
*: Valores de temperatura de hibridación y número de ciclos de la primera y segunda PCR.

Tabla 20.5. Valores mínimos de detección de los métodos de detección en el diagnóstico de candidiasis invasoras.

ADN blanco	Método	Detección	Límite de detección
Actina	PCRe	Sonda radioactiva	0 cel/0'1 ml
HSP	PCRe	BrEt	100 UFC/ml
ADN mitocondrial	PCRe	S.B.	3 cel/0'1 ml
ADNr	PCRe	REA	15 cel/0'1 ml
Sintetasa quitina	PCRe	S.B.	10 UFC/0'1 ml
P450	PCRa	BrEt	1 pg de ADN
P450	PCRe	S.B.	10-20 cel/0'1 ml
5S ADNr + NTS	PCRe	BrEt	15 UFC/ml
5'8S ADNr + ITS	PCRe	EIA	2 cel/0'2 ml
18S ADNr	PCRe	S.B.	10-15 UFC/0'1 ml
18S ADNr	PCRe	BrEt-S.B.	10-100 cel/ml
18S ADNr	ISH	—	2-3 cel/0'5 ml
18S ADNr	PCRe	S.B.	1 UFC/ml
18S ADNr	PCRe	ELISA	5 UFC/ml

Abreviaturas: NTS: espaciadores no transcritos; HSP: Proteína choque térmico; PCRe: PCR estándar; PCRa: PCR anidada; ISH: Hibridación "in situ"; BrEt: tinción con bromuro de etidio; S.B.: Southern blotting; REA: análisis de restricción por endonucleasa.

identificación tiene limitaciones. Por una parte, la gran homología de secuencia dentro de los hongos no permite en muchos casos diferenciar especies y por otra, la gran longitud del gen exige comparar largas secuencias nucleotídicas. No obstante, pueden encontrarse diversas técnicas moleculares de

diagnóstico que analizan esta región mediante amplificación por PCR y/o hibridación. De hecho existen sondas específicas y cebadores para detectar *Candida* [23], *Aspergillus* [24,25,27], *Trichophyton*, *Microsporium*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Histoplasma* y *Penicillium* [7,26].

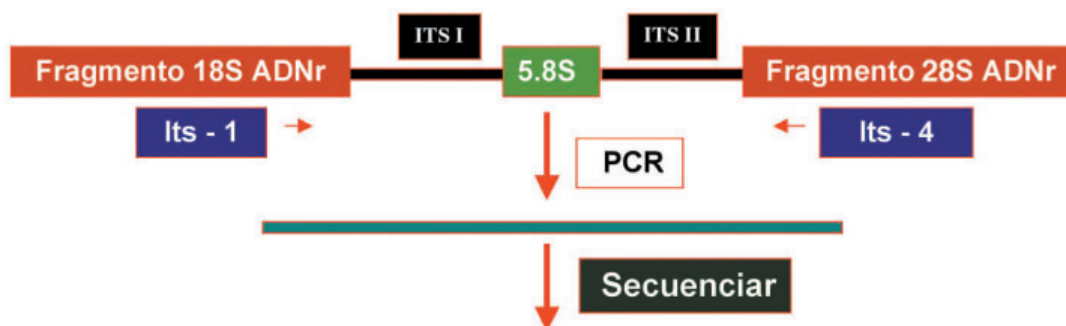


Figura 20.1. Estructura del ADN ribosómico, con los fragmentos ITS (Internal Transcriber Spacers). La amplificación de estas zonas de ADNr utilizando los iniciadores ITS-1 e ITS-4 y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados, permite diferenciar entre la mayoría de las especies fúngicas. La técnica de PCR en tiempo real permite automatizar el proceso y cuantificar la detección.

Gen de la subunidad 28S. Ha sido utilizado principalmente para estudios filogenéticos. Presenta regiones variables pero su tamaño es superior al del gen 18S. Resulta una región válida para diferenciación en niveles taxonómicos altos (por encima de especie). Existen trabajos que utilizan esta región para detectar infección fúngica por amplificación mediante PCR, pero centrándose en las regiones variables [2].

Región de los espaciadores. Esta región incluye los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2 y el gen de la subunidad 5.8S. Actualmente, este es el fragmento más utilizado como diana para la detección e identificación de hongos. El fragmento completo tiene una longitud aproximada de 600 pares de bases (su tamaño varía según la especie). El gen 5.8S no es válido para filogenia ni identificación, pero es una excelente diana para unión de cebadores universales puesto que la secuencia está muy conservada y es de pequeño tamaño. Las regiones espaciadoras tienen secuencias con variabilidad interespecie (con algunas excepciones). En conjunto ofrecen una magnífica diana puesto que las regiones conservadas facilitan el diseño de cebadores que se unen en todos los hongos; además, el fragmento que flanquean posee secuencias variables para las diferentes especies de un género. Por otra parte, el pequeño tamaño del segmento facilita el estudio y comparación de la secuencia. La mayoría de las técnicas moleculares se centran en el estudio de esta región [3,28,29].

El hallazgo de zonas variables, como los fragmentos ITS 1 y 2 del ADN ribosómico (ADNr) o las zonas D1/D2 del 28S de ADNr, están desplazando las pruebas basadas en la detección del 18S. Para seleccionar la diana más adecuada en cada caso primero hay que preguntarse ¿qué se busca? Obviamente, se busca ADN fúngico pero es importante definir una de las dos estrategias posibles:

1. *Inespecífica (métodos no orientados):* Detecta cualquier hongo que se encuentre en la muestra.
2. *Específica (métodos orientados):* Detecta hongos de una especie determinada, por ejemplo *Candida albicans*, o de un género concreto (*Candida*, *Aspergillus*, etc.).

Para cada uno de los planteamientos se combinará una diana determinada y un método de detección. Se pueden detectar dianas diferentes aunque se trabaje en la misma región del genoma (ADN ribosómico) y, dependiendo de la metodología utilizada, desarrollar una estrategia de tipo específico o inespecífico.

20.5. Métodos de amplificación y detección

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR – Polymerase Chain Reaction) ha sobrepasado a otras técnicas de diagnóstico basadas en los ácidos nucleicos, como el Southern Blot, debido a su simplicidad, sensibilidad, rapidez y especificidad. La PCR permite la amplificación de la región del genoma seleccionada para análisis, en un tiempo mínimo (aproximadamente 3^{1/2} h). No obstante, los métodos de hibridación siguen teniendo cierto lugar en diagnóstico, por lo que se comentan brevemente.

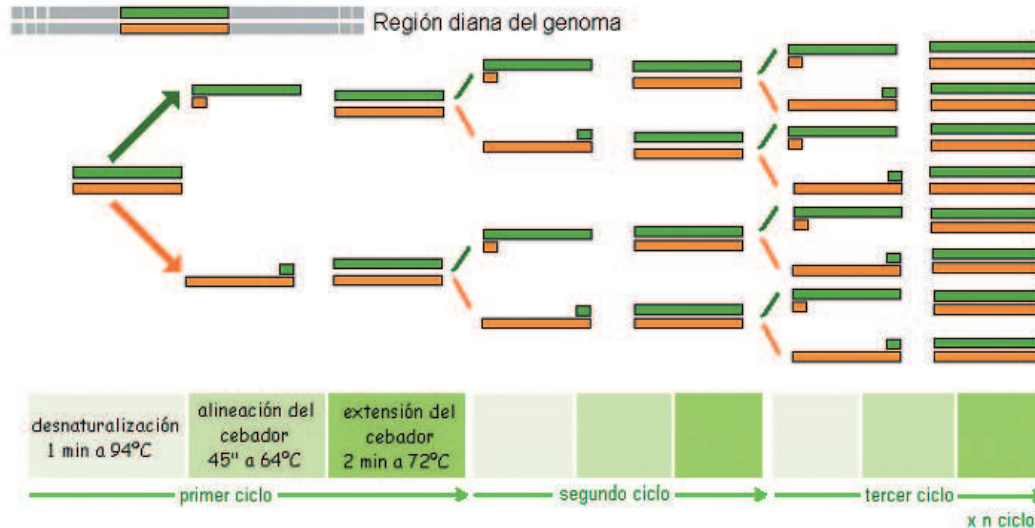


Figura 20.2. Representación del proceso de amplificación de fragmentos de ácido nucleico mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Lo tres pasos que se repiten representan un ciclo completo, con las fases de desnaturalización (separación de cadenas), unión de los cebadores a cada hebra y síntesis de la copia del fragmento diana. El proceso se repite tantos ciclos como se programe, obteniéndose un elevado número de copias idénticas de la diana.

20.5.1. Técnicas de hibridación

Emplean sondas de ADN para detectar la presencia de un organismo determinado. La sonda es una cadena única de ADN que se ha sintetizado para que sea complementaria a la secuencia que se quiere detectar y que va marcada para poder identificarla después de la hibridación. Las técnicas más extendidas dentro de este grupo son las que detectan ADN ribosómico de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Penicillium marneffei* y *Cryptococcus neoformans*. Algunas de estas técnicas se han llegado a comercializar empleando quimioluminiscencia como sistema de revelado (AccuProbe: Gen-Probe, San Diego, EE.UU.). Se parte de una pequeña porción de la colonia a identificar, se extrae el RNA y luego se permite que hibride con sondas marcadas con ésteres de acridina, captándose la luz emitida por medio de un luminómetro [7].

Las pruebas de hibridación *in situ* se han empleado para localizar ácidos nucleicos de los microorganismos en tejidos. Esta técnica ha sido usada para la identificación de *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. Aunque el proceso es rápido y sencillo de realizar, la sensibilidad de la prueba es frecuentemente más baja que las pruebas de amplifi-

cación de ácidos nucleicos. La hibridación *in situ* y revelado mediante la observación microscópica de fluorescencia, se ha aplicado también para la identificación de *Candida* spp. y algunos hongos filamentosos directamente en muestras clínicas. Habitualmente, la diana empleada es el fragmento 18S del RNA ribosómico, que tiene una especificidad limitada, con abundantes falsos positivos.

20.5.2. Técnicas de amplificación

Además de la PCR convencional últimamente ya están apareciendo trabajos para la detección de ADN fúngico mediante PCR a tiempo real. La PCR consiste básicamente en la localización de secuencias específicas por complementariedad de bases, como en la hibridación; pero una vez halladas, la PCR las copia múltiples veces amplificando su presencia y por tanto su señal mientras que la hibridación simplemente las marca. En la hibridación suelen utilizarse compuestos que emiten una señal fluorescente para marcar las secuencias diana. El producto (amplicón) generado en la PCR clásica se suele detectar mediante electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio.

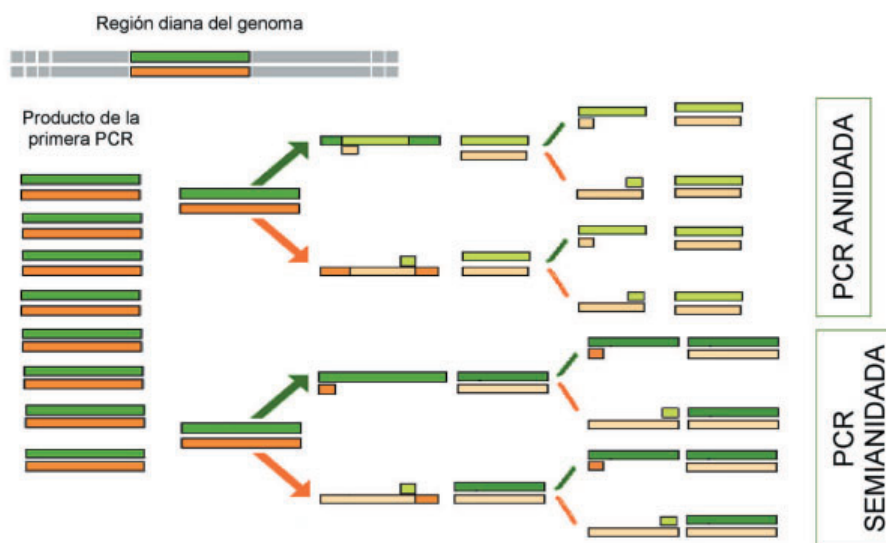


Figura 20.3. Obtención de fragmentos específicos de ácido nucleico mediante la técnica de la PCR anidada. Se parte del producto de la primera PCR (Figura 20.1) y se somete a una nueva amplificación que puede ser: con cebadores nuevos que hibriden en regiones comprendidas en la primera diana (PCR Anidada o *Nestred PCR*); o con un cebador igual a la primera amplificación junto con uno nuevo que hibrida dentro de la región amplificada (PCR Semianidada o *Seminested PCR*).

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8

20.5.3. Combinaciones de ambas técnicas

Existen otras técnicas en las que básicamente se utiliza la PCR para obtener una gran cantidad de fragmento diana y, posteriormente, la hibridación como método para detectar la presencia de dicha secuencia. Estas técnicas pueden combinarse con métodos moleculares inmunológicos que generalmente aportan el sistema de marcado de secuencias específicas. De esta forma, puede plantearse la hibridación con una sonda complementaria del amplicón y la detección mediante inmunoanálisis (EIA), que proporciona una lectura colorimétrica o fluorescente automatizada.

20.5.4. Principales técnicas de detección e identificación de ADN fúngico basadas en la PCR

La PCR amplifica una región específica del genoma mediante unos cebadores (Figura 20.2). Diferenciándose entre las que usan cebadores específicos (búsqueda orientada) y aquellas que usan cebadores universales para detectar cualquier tipo de ADN fúngico en la muestra. En el primer caso, un resultado positivo en la PCR ya indica el género o especie fúngica; en el segundo, solo indica la presencia de un hongo en la muestra pero sin

conocer su especie. Posteriormente, para identificar la especie se puede elegir entre una amplia gama de técnicas moleculares, cada una de ellas con sus ventajas e inconvenientes.

Identificación orientada: búsqueda específica

Estas técnicas permiten la identificación de hongos en el ámbito del género o de la especie, en base a la utilización de sondas o cebadores diseñados específicamente para detectar una secuencia conocida de un hongo concreto.

PCR simple. Amplificación mediante una pareja de cebadores específicos de género o especie, dependiendo del objetivo planteado (Figura 20.2).

PCR anidada. Se incorpora una segunda pareja de cebadores para una segunda amplificación en la que se utiliza como diana el producto amplificado en la primera PCR. Esta técnica tiene también una modificación llamada "PCR-semianidada" (snPCR) en la que la segunda PCR mantiene uno de los cebadores de la primera y añade uno nuevo que acorta la región amplificada y detecta fragmentos más específicos, generalmente especie-específicos. Se ha comprobado una alta efectividad en la detección de especies patógenas de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*) (Figura 20.3).

PCR múltiple. Varias parejas de cebadores se utilizan en una misma PCR. Este método ha sido ensayado en identificación de hongos filamentosos [30] y diferentes especies de *Candida* [1,31].

PCR con posterior hibridación con sondas específicas. PCR con cebadores universales seguida de hibridación con sondas oligonucleotídicas específicas de especie. Este método ha sido utilizado en la identificación de muchas levaduras y hongos filamentosos patógenos [32]. Los trabajos desarrollados para detectar candidemias o aspergilosis con PCR-EIA han demostrado una elevada efectividad, además de aumentar el número de muestras analizables y realizar la semi-cuantificación de las mismas.

Identificación no orientada: búsqueda inespecífica

PCR y polimorfismos de tamaño. Este método consiste en diferenciar individuos en función del tamaño de una diana determinada, tras su amplificación por PCR y separación en gel de agarosa. Dependiendo de la variabilidad de tamaño de la región amplificada se podrá aplicar a la identificación en diferentes niveles taxonómicos. Hay trabajos en los que se ha aplicado este método a la identificación de levaduras (*Candida* y no-*Candida*), de hongos filamentosos, como *Aspergillus*, y de ciertos dermatofitos. Algunos de estos estudios comparan el tamaño de la región ITS2 tras su amplificación por PCR [28,33].

PCR-RFLP. PCR y polimorfismo de tamaño de fragmentos de restricción (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Este método amplifica la diana seleccionada y analiza la secuencia del fragmento obtenido a través del resultado que ofrece la digestión del mismo con diferentes enzimas de restricción. Cada enzima de restricción tiene una secuencia específica que es su señal para cortar el ADN. El resultado de la digestión de un fragmento con una determinada enzima, depende directamente de la secuencia de nucleótidos de ese fragmento. Cuanto más se asemejen en secuencia dos fragmentos, más similar será el patrón de restricción obtenido. La técnica se ha utilizado en numerosas experiencias para identificación de levaduras mediante digestión de la región del gen 5.8S y sus espaciadores [34].

PCR-SSCP. PCR y polimorfismo de conformación de hebra simple (SSCP: *Single Strand Conformational Polymorphism*). Además de la identificación basada en el tamaño del fragmento amplificado, esta técnica tiene en cuenta la composición nucleotídica para identificar especies. Para hebras del mismo tamaño, la migración será diferente según su composición en nucleótidos; posterior-

mente, se analiza la migración que hacen las hebras simples de ADN del fragmento amplificado por PCR. Las diferencias en el desplazamiento en el gel permiten su identificación [24]. Esta técnica no valora el orden en que aparecen los nucleótidos en el fragmento.

PCR y secuenciación del ADN. Este método aporta la máxima información puesto que valora el tamaño, la composición nucleotídica y el orden de las bases en el fragmento de ADN en estudio. Las secuencias de las zonas ITS y de las D1/D2 se emplean en la identificación de la mayoría de especies fúngicas. Las secuencias se introducen en programas informáticos, que comparan la cepa problema con las secuencias de cepas control, conocidas por bases de datos de referencia, como el Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>) o el EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>). Las comparaciones deben realizarse con cepas cuya identificación no ofrezca dudas y que provengan de centros de referencia acreditados.

Este planteamiento ofrece nuevas posibilidades a la microbiología asistencial, pues pueden identificarse y distinguirse la práctica totalidad de las especies fúngicas. De esta forma, si la secuenciación de los fragmentos antes señalados no permite distinguir entre especies, pueden emplearse otras dianas como factores de elongación, la beta-tubulina, etc.

PCR a tiempo real (Real Time PCR). Con esta técnica, la recolección y el análisis de datos se producen al mismo tiempo que la reacción de amplificación de dianas. Para ello, al mismo tubo de reacción se añaden marcadores de ADN o sondas fluorescentes; de esta forma, durante la amplificación se mide la aparición de ciertos componentes y así es posible recoger y analizar los datos al mismo tiempo (Figura 20.4). Por lo tanto, con esta técnica no hay transferencia de muestras, no se añaden nuevos reactivos ni tampoco se utiliza el gel de agarosa para ver los resultados. Con todo ello se consigue minimizar el problema de la contaminación denominada "carry over" que proviene de los mismos amplicones obtenidos en PCRs anteriores. La cantidad de ADN diana inicial determina el incremento de fluorescencia que se va obteniendo en cada ciclo.

El sistema más utilizado en los laboratorios asistenciales es el *LightCycler* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Esta tecnología combina la amplificación rápida en capilares mediante aire caliente, junto a la detección simultánea del amplicón, mediante un sistema de marcado con fluorocromos. El sistema de detección se basa en la transferencia por resonancia de energía fluorescente con dos sondas específicas distintas. La primera sonda de hibridación marcada con fluoresceína y una segunda sonda de hibridación marcada con el fluoróforo LightCycler Red 640. Ambas sondas

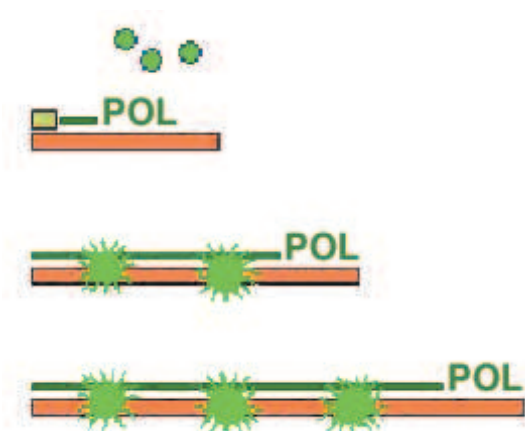


Figura 20.4. Representación del sistema de amplificación y lectura de PCR a tiempo real (*real time PCR*). La unión de SYBR® Green I a la doble cadena de ADN durante su síntesis va acompañada de la emisión de una señal que permite detectar en cada momento la presencia del fragmento diana y extrapolar la cantidad de la misma en la muestra inicial.

hibridan con el amplicón en posición *cabeza-cola*, es decir que el marcador fluorescente y el fluoróforo quedan muy próximos. En esa posición se produce una transferencia de energía entre ambos, lo que determina la emisión de fluorescencia que es medida por el sistema, siendo proporcional a la cantidad de ADN generado durante el proceso de PCR. A día de hoy, la fluorescencia con SYBR Green I es el indicador de elección para la PCR a tiempo real, pero existen variantes dependiendo del marcador y la técnica utilizada [5,15,35].

Esta tecnología presenta ventajas evidentes: la amplificación y detección se realizan en los mismos tubos cerrados o capilares (lo que minimiza la contaminación), es un proceso rápido (<2 h), automatizable y, además, permite la comparación de resultados entre laboratorios.

Hasta la fecha, se han publicado varios estudios sobre la utilidad de la PCR-tr en el diagnóstico directo de las infecciones fúngicas. Sobre todo, en la detección de *Aspergillus* en enfermos de alto riesgo. Aunque se han empleado diferentes técnicas y amplificado diversas dianas, el ADN ribosómico y el ADN mitocondrial han sido los más utilizados, especialmente secuencias de la zona 18S ó 28S del ADN ribosómico. Para la amplificación de estas zonas se han utilizado sondas marcadas del tipo Taqman, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) o iniciadores específicos y fluorocromos del tipo SYBRGreen. Los resultados de estos trabajos han sido variables, dependiendo del grupo de pacientes, de las muestras utilizadas y de las comparaciones utilizadas. En términos generales, las técnicas de PCR-tr detectan con eficacia *Aspergillus* spp. en muestras respiratorias, mostrando una rentabilidad superior a la de los cultivos tradi-

cionales. Sin embargo, la rentabilidad desciende en muestras sanguíneas. En algunos centros con gran cantidad de pacientes oncohematológicos, la PCR-tr se utiliza como prueba complementaria de la detección de galactomanano y de la tomografía axial computerizada de alta resolución.

20.6. Métodos de tipado intraespecie

Las técnicas de tipado de las especies fúngicas se desarrollaron a partir de las utilizadas para la clasificación de las bacterias. En los últimos años, se están aplicando varias técnicas que han demostrado su capacidad para el tipado aunque la utilidad de las mismas depende de la especie en cuestión. Además, no todos los métodos tienen las mismas aplicaciones, ya que algunos ayudan a tipificar brotes de infección, con cepas relacionadas temporal y espacialmente, y otros sirven para realizar estudios de genética de poblaciones.

En la **tabla 20.6** se incluyen las técnicas utilizadas en la tipificación de las especies fúngicas. Históricamente, el primer método empleado en micología fue el análisis con enzimas de restricción o RFLP de genoma total, pero su escaso poder de discriminación hizo que fuera reemplazado por otros métodos [36]. De esta forma, una de las posibilidades es complementar el análisis de enzimas de restricción con métodos de ADN *fingerprinting*, procedimiento que sirve para simplificar el patrón de bandas a analizar tras la electroforesis. Esta técnica se ha convertido en la técnica de referencia para tipificar muchas levaduras, como *C. albicans*. Para tipar cepas de esta especie se emplean sondas del tipo 27A y Ca3, con múltiples copias, o *repeated DNA sequences* (RDS), algunas de las cuales han sido incluidas en sistemas semi-comerciales. También se ha utilizado el método de *fingerprinting* con pequeños fragmentos u oligonucleótidos, generalmente con los llamados mini y microsátélites.

Otra de las técnicas desarrolladas en los últimos años es la electroforesis en campo pulsante, método empleado para separar cromosomas o fragmentos grandes de ADN. Es un método tedioso, caro y, además, su capacidad de diferenciación no es muy elevada para la mayoría de las especies.

También se han utilizado técnicas que no utilizan el ADN como diana, este es el caso de las isoenzimas o electroforesis de enzimas multilocus. Este método detecta sustituciones de aminoácidos y se ha utilizado para realizar genética de poblaciones.

Tabla 20.6. Técnicas utilizadas en la tipificación de las especies fúngicas.

1. Análisis con enzimas de restricción (RFLP, Restriction Fragments Length Polymorphism)
2. Análisis de enzimas de restricción con métodos de simplificación de ADN *fingerprinting*
3. Análisis de enzimas de restricción con métodos de amplificación con microsatélites
4. Electroforesis en campo pulsante
5. Electroforesis de enzimas multiloculares
6. Técnicas de PCR:
 - RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
 - SSDP (Sequence-Specific DNA Primers)
 - PMM (Polymorphic Microsatellite Markers)
 - MLST (Multilocus Sequencing Typing)

Como en el caso de la micología diagnóstica, las técnicas de tipado intraespecie se han ido adaptando a los métodos basados en la amplificación de fragmentos mediante PCR. Este es el caso del RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), del SSDP (Sequence-Specific DNA Primers), del PMM (Polymorphic Microsatellite Markers) y del MLST (Multilocus Sequencing Typing) [37]. Hasta la fecha, los resultados más abundantes se deben a la técnica de RAPD, con algunos cebadores como el R108 y el R151 que sirven para tipar cepas de *Aspergillus*; pero existen problemas de interpretación y de reproducibilidad debido a las condiciones que suelen emplearse para realizar la PCR (bajas temperaturas de annealing y cebadores demasiado cortos). Por eso, la mayoría de los expertos recomiendan utilizar dos técnicas de tipificación o dos cebadores diferentes a la hora de tipar cepas relacionadas. Entre otras, se proponen el uso de secuencias microsatélites como el fago M13 y mini-satélites como el (GACA)₄ para clasificar varias especies fúngicas; así como, la PCR-RFLP del gen URA5, especialmente útil en el tipado intraespecie del complejo *Cryptococcus neoformans* [38,39]. En cuanto al MLST, se han desarrollado varios protocolos para *C. albicans* y parece la técnica de futuro para realizar genética de poblaciones.

20.7. Utilidad de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico microbiológico directo

Las técnicas moleculares diagnósticas se incluyen dentro de los métodos alternativos al cultivo, desarrollados en los últimos años, con la intención de mejorar la rentabilidad de las pruebas microbiológicas. Estas técnicas se aplican, generalmente, en el diagnóstico de infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, para los que el diagnóstico tradicional es poco sensible y, además, tardío.

En micología médica, las técnicas alternativas al cultivo se han desarrollado como métodos de diagnóstico precoz de las micosis invasoras en enfermos inmunodeprimidos. La rentabilidad actual de estas técnicas no es muy elevada, aunque en algunas instituciones sanitarias, la detección de componentes fúngicos, como el galactomanano y el beta-glucano, se incluye rutinariamente entre las pruebas diagnósticas que se realizan en enfermos oncohematológicos con alto riesgo de micosis invasoras, particularmente de aspergilosis y de candidiasis.

Hasta ahora, los métodos moleculares basados en la detección de ácidos nucleicos de las especies fúngicas, apenas se han implantado en los laboratorios asistenciales. Esto se debe, principalmente, a que no se han desarrollado métodos comerciales reproducibles, por lo que sólo aquellos laboratorios que cuentan con el personal y los equipos necesarios han desarrollado y adaptado técnicas *caseras*, que precisan de consolidación y estandarización para su aplicación en otros centros.

En la literatura científica sobre este asunto pueden encontrarse todo tipo de técnicas de detección de especies, como ya se ha explicado en los apartados anteriores. No obstante, la amplificación de ácidos nucleicos mediante la PCR es el método más extendido para el diagnóstico directo en muestras clínicas [13].

Las contaminaciones y los falsos positivos son frecuentes, particularmente con especies fúngicas que causan infecciones oportunistas y que son contaminantes habituales de laboratorio, como *Aspergillus*, *Fusarium* o *Acremonium*. Por ello, las técnicas de amplificación cuantitativas, como la PCR *en tiempo real* (PCR-tr), están desplazando a los métodos basados en la PCR convencional. La PCR-tr presenta varias ventajas entre las que destacan, la posibilidad de introducir puntos de corte a la hora de interpretar los resultados, aumentando la especificidad de la técnica, así como la automatización de la amplificación, visualización e interpretación de los resultados.

20.8. Conclusiones

La aparición de métodos basados en la PCR, así como la difusión de las técnicas de cuantificación de ácidos nucleicos, como la PCR en tiempo real, pueden ayudar a la implantación del diagnóstico molecular en la práctica microbiológica asistencial. Estas técnicas están automatizadas, parcial o totalmente, y aportan sistemas comerciales de extracción, purificación, amplificación y detección de ácidos nucleicos, por lo que existe la posibilidad de elaborar protocolos estandarizados, aplicables a los laboratorios clínicos, con fiabilidad metodológica y, quizá, rentabilidad diagnóstica.

Actualmente, algunos centros con experiencia, como algunos hospitales terciarios y centros de referencia, utilizan métodos basados en la biología molecular, como complemento de las técnicas clásicas en el diagnóstico de las IFI. Estas micosis no son frecuentes en muchos de los centros de nuestro Sistema Nacional de Salud, ya que atienden a pocos enfermos con riesgo de este tipo de infección. Por ello, ante una sospecha de IFI se recomienda contactar con alguno de los centros con experiencia y valorar la posibilidad de emplear un método de diagnóstico molecular.

Referencias

- Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3466-3471.
- Evertsson U, Monstein HJ, Johansson AG. Detection and identification of fungi in blood using broad-range 28S rDNA PCR amplification and species-specific hybridisation. *APMIS* 2000; 108: 385-392.
- Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2873-2879.
- Kirby A, Chapman C, Hassan C, Burnie J. The diagnosis of hepatosplenic candidiasis by DNA analysis of tissue biopsy and serum. *J Clin Pathol* 2004; 57: 764-765.
- Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 487-496.
- Scotter JM, Stevens JM, Chambers ST, Lynn KL, Patton WN. Diagnosis of *Aspergillus* peritonitis in a renal dialysis patient by PCR and galactomannan detection. *J Clin Pathol* 2004; 57: 662-664.
- Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA, van BJ, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1353-1360.
- Ferns RB, Fletcher H, Bradley S, Mackinnon S, Hunt C, Tedder RS. The prospective evaluation of a nested polymerase chain reaction assay for the early detection of *Aspergillus* infection in patients with leukaemia or undergoing allograft treatment. *Br J Haematol* 2002; 119: 720-725.
- Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Canine M. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 925-930.
- Chryssanthou E, Andersson B, Petrini B, Lofdahl S, Tollemar J. Detection of *Candida albicans* DNA in serum by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis* 1994; 26: 479-485.
- Meletiadi J, Melchers WJ, Meis JF, Van Den HP, Jannes G, Verweij PE. Evaluation of a polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay for the detection and identification of medically important fungi in bronchoalveolar lavage fluids. *Med Mycol* 2003; 41: 65-74.
- Składny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mosch C, Hehlmann R. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3865-3871.
- Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 465-484.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor S. Amplifications and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, Inc, 1990.
- Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3159-3163.
- Khan ZU, Mustafa AS. Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol Res* 2001; 156: 95-102.
- Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis* 1993; 168: 779-783.
- Nosek J, Tomaska L, Rycovska A, Fukuhara H. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1283-1289.
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J Med Microbiol* 2000; 49: 493-497.
- Dammann R, Lucchini R, Koller T, Sogo JM. Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5294-5303.
- Ferrer C, Montero J, Alio JL, Abad JL, Ruiz-Moreno JM, Colom F. Rapid molecular diagnosis of posttraumatic keratitis and endophthalmitis caused by *Alternaria infectoria*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3358-3360.
- Ferrer C, Munoz G, Alio JL, Abad JL, Colom F. Polymerase chain reaction diagnosis in fungal keratitis caused by *Alternaria alternata*. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 398-399.
- Lischewski A, Kretschmar M, Hof H, Amann R, Hacker J, Morschhauser JJ. Detection and identification of *Candida* species in experimentally infected tissue and human blood by rRNA-specific fluorescent in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2943-2948.
- Rath PM, Ansorg R. Identification of medically important *Aspergillus* species by single strand conformational polymorphism (SSCP) of the PCR-amplified intergenic spacer region. *Mycoses* 2000; 43: 381-386.
- Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2464-2468.
- Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reac-

- tion assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. Eur J Clin Invest 2000; 30: 511-518.
27. Park CS, Kim J, Montone KT. Detection of *Aspergillus* ribosomal RNA using biotinylated oligonucleotide probes. Diagn Mol Pathol 1997; 6: 255-260.
 28. Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. J Clin Microbiol 1999; 37: 1846-1851.
 29. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Utrecht/Reus, Centraalbureau voor Schimmelcultures; Universitat Rovira i Virgili, 2000.
 30. Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 2860-2865.
 31. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. J Clin Microbiol 2001; 39: 3617-3622.
 32. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. J Clin Microbiol 2000; 38: 3016-3021.
 33. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulia-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin Microbiol 2000; 38: 2302-2310.
 34. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int J Syst Bacteriol 1999; 49 Pt 1: 329-337.
 35. Jordanides NE, Allan EK, McLintock LA, Copland M, Devaney M, Stewart K, Parker AN, Johnson PR, Holyoake TL, Jones BL. A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. Bone Marrow Transplant 2005; 35: 389-395.
 36. Ponton J, Moragues MD, Quindos G. Non-culture-based diagnostics. In: Calderone RA (Ed.) *Candida* and Candidiasis. Washington DC, ASM Press, 2002: 395-425.
 37. Cuenca-Estrella M, Mellado E. Are molecular techniques useful in aspergillosis surveillance and control? Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21: 469-471.
 38. Frases S, Ferrer C, Sánchez M, Colom MF. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* species complex strains from human, animal and environmental samples in Spain. (manuscrito en preparación).
 39. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis 2003; 9: 189-195.