

Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares

Mycological diagnosis: From conventional methods to molecular ones

Verónica J. Tangarife-Castaño MSc¹,
Sindy V. Flórez-Muñoz Bio², Ana C. Mesa-Arango PhD³

Resumen: La incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado en las últimas décadas como consecuencia del incremento en el número de pacientes con factores predisponentes. Tanto el diagnóstico como el tratamiento de estas infecciones continúan siendo un reto para el personal de la salud. Aunque las especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* continúan siendo las más frecuentes, es notoria la emergencia de especies que no se habían reconocido anteriormente como patógenas para el hombre. Ante este panorama, el diagnóstico adecuado y oportuno de estas infecciones es de gran relevancia para la instauración de un tratamiento eficaz y, de esta manera, para impactar en la morbilidad y mortalidad que suelen causar algunas micosis, principalmente en los individuos inmunocomprometidos. Con esta revisión se pretende mostrar de manera general aspectos clínicos, epidemiológicos y, principalmente, relacionados con el diagnóstico de las infecciones fúngicas más frecuentes, partiendo de los métodos convencionales hasta las técnicas moleculares que actualmente se tratan de implementar en busca de un la prueba estándar de referencia que pueda superar la sensibilidad, la especificidad, la rapidez y el costo-efectividad de los métodos que se han utilizado hasta ahora en el diagnóstico micológico.

Palabras clave: micosis, técnicas de laboratorio clínico, técnicas de diagnóstico molecular, epidemiología.

Abstract: Fungal infections incidence has risen in recent decades due to the increase of many predisposing factors. The diagnosis and treatment of such infections continue to be a challenge for clinicians. Although some species of the genus *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* remain as the

¹Microbióloga y Bioanalista. Candidata a MSc en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia. Estudiante de maestría, Grupo de Investigación Dermatológica (GRID), Universidad de Antioquia. Coordinadora Científica, Editora Médica Colombiana S.A. Medellín, Colombia.

²Estudiante de Biología, Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación Dermatológica (GRID), Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

³Bacterióloga y laboratorista clínica, especialista en Micología Médica, MSc en Biología Experimental, PhD en Microbiología y Parasitología. Docente, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación Dermatológica (GRID), Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Correspondencia: Carrera 51 D No. 62-29. Oficina 303, Edificio Manuel Uribe Ángel (MUA), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Correo electrónico: ana.mesa@udea.edu.co.

Conflicto de intereses: las autoras declaran que no tienen conflicto de intereses

Medicina & Laboratorio 2015; 21: 211-242

Módulo 1 (La clínica y el laboratorio), número 110. Editora Médica Colombiana S.A. 2015®

Recibido el 17 de mayo de 2015; aceptado el 30 de junio de 2015

most frequent, have emerged more fungal species not formerly recognized as pathogenic. Therefore, there is an increasing need for an appropriate and quick diagnosis of such infections in order to start an effective treatment and thus to impact on morbidity in the majority of patients and on mortality in the immunosuppressed. This review focuses in clinical and epidemiological features, but also in the diagnostic of most common fungal infections, based on conventional methods and new molecular techniques to search an standard test that be to more sensitive and specific, faster and cost-effective.

Key words: *Mycoses, clinical laboratory techniques, molecular diagnostic techniques, epidemiology.*

Tangarife-Castaño VJ, Flórez-Muñoz SV, Mesa-Arango AC. Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares. *Medicina & Laboratorio* 2015; 21: 211-242.

La incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado significativamente en las últimas décadas y actualmente representan un importante problema de salud para los humanos. Este incremento se ha producido principalmente por el creciente número de pacientes sometidos a tratamientos con inmunosupresores para trasplantes, que reciben quimio o radioterapia, neutropénicos, enfermos que han sufrido cirugía grave (principalmente abdominal) o inmunocomprometidos, especialmente por la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Existen otros factores que contribuyen a la aparición de nuevos casos de infecciones fúngicas y hacen a los pacientes más vulnerables, como el uso de antibióticos de amplio espectro, la hospitalización prolongada, la nutrición parenteral, la edad avanzada y la diabetes [1-4].

La presentación de las infecciones fúngicas puede variar desde formas superficiales (piel y mucosas) a invasivas o diseminadas, estas últimas asociadas a altas tasas de morbilidad y mortalidad, a pesar de la disponibilidad de antifúngicos con diferente espectro de actividad para su tratamiento [5]. La epidemiología de las infecciones fúngicas ha cambiado de manera importante en los últimos años y, aunque las especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* continúan siendo las más frecuentes, es notoria la aparición de nuevas especies, algunas de ellas con baja sensibilidad o resistentes a los principales antifúngicos de uso clínico [2,6]. En esta revisión presentamos de manera general diferentes aspectos de las infecciones fúngicas más frecuentes, con énfasis en los métodos diagnósticos más utilizados, así como la tendencia actual en este tópico.

Importancia de los hongos en la salud humana

Los hongos son microorganismos de distribución mundial con una diversidad que puede oscilar entre 600.000 y 700.000 especies en la naturaleza [7,8], de las cuales aproximadamente 200, y con tendencia a aumentar, pueden producir enfermedades en el hombre [9-11]. Las infecciones causadas por hongos comprenden desde micosis superficiales, las cuales son comunes y relativamente fáciles de curar, hasta sistémicas e invasivas, que pueden amenazar la vida de las personas [12] debido, principalmente, a las condiciones de las poblaciones que afectan y a las dificultades para realizar el diagnóstico. Lo anterior, puede impedir la instauración de una terapia oportuna y eficaz. Además, el incremento de la resistencia antimicótica de diferentes especies, así como la emergencia de otras menos sensibles o resistentes, es una situación que ha ido complicando el panorama de las micosis [13].

Aunque existen diversos estudios sobre la frecuencia, la incidencia y la prevalencia de las infecciones fúngicas en algunos países, la mayoría de estos están localizados geográficamente, lo que impide que la dimensión mundial del impacto sobre la salud humana se conozca completamente. Además, estas infecciones no son reconocidas por la Organización Mundial de la Salud u otros organismos de salud pública en el mundo como un motivo de estudio y manejo prioritario, por lo que actualmente no se cuenta con programas de vigilancia y notificación de enfermedades micóticas instaurados, a excepción de la coccidioidomicosis, la cual debe ser notificada a los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos [12].

La incidencia de las micosis es mayor en las zonas tropicales y subtropicales, donde probablemente la temperatura y la humedad faciliten el crecimiento y la transmisión de los agentes causales [14]. Estas infecciones afectan personas de cualquier condición social, etaria y género; no obstante, las alteraciones en el sistema inmune, la edad avanzada, los tratamientos con corticosteroides, la quimioterapia para el cáncer, la diabetes y la infección con el VIH/SIDA representan las principales condiciones de riesgo para padecerlas [12].

Las micosis superficiales son tal vez las más estudiadas y de las que más datos se disponen a nivel mundial. En América Latina, por ejemplo, en países como Brasil, Chile y Venezuela se registran aproximadamente entre 500 y 1.500 casos de micosis superficiales anualmente [15-17]. Por su parte, las infecciones fúngicas invasivas y diseminadas tienen una incidencia mucho más baja que las superficiales; sin embargo, presentan tasas de mortalidad más elevadas, llegando a superar el 50% de los casos, a pesar de la disponibilidad de diversos agentes antimicóticos en el mercado. Se estima que anualmente pueden morir cerca de un millón y medio de personas por infecciones fúngicas invasivas, superando las cifras de mortalidad por tuberculosis o malaria [12].

La frecuencia de las infecciones fúngicas invasivas por hongos filamentosos ha aumentado durante la última década, debido, en parte, al incremento en el número de pacientes con factores de riesgo. Dentro de estas infecciones, la aspergilosis y la fusariosis son las más frecuentes e importantes por las altas tasas de morbilidad y mortalidad que causan en pacientes neutropénicos o trasplantados (de órganos sólidos o de progenitores hematopoyéticos) [18,19]. Nucci y colaboradores (2010) [20], en una revisión sistemática sobre la epidemiología de las infecciones invasivas en América Latina reportadas de 1990 a 2008, registraron entre 86 y 924 casos de candidemia en Brasil, 116 en México, entre 25 y 265 en Argentina, entre 50 y 130 en Chile y 110 en Costa Rica. Por otro lado, una evaluación de la incidencia de la criptococosis, llevada a cabo por el Grupo de Estudio Iberoamericano de criptococosis (2003) [21], registró un total de 266 aislamientos clínicos de *Cryptococcus neoformans* en Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México, Perú, Venezuela, Guatemala y España.

En Colombia no existen estudios poblacionales sobre la incidencia o la prevalencia de las diferentes micosis, en parte por no tratarse de enfermedades de notificación obligatoria. Sin embargo, se han publicado diferentes estudios institucionales que dan idea de la situación de las diferentes micosis desde el punto de vista clínico, epidemiológico y de diagnóstico. Con respecto a las infecciones superficiales, en un centro hospitalario de la ciudad de Medellín, se demostró que son la sexta causa de consulta dermatológica [22]. Entre éstas infecciones, las dermatofitomicosis y la onicomycosis se han registrado como las más prevalentes [23,24].

En cuanto a las micosis subcutáneas, la esporotricosis es la más importante en Colombia [25]. Un estudio retrospectivo de 11 años llevado a cabo en un centro dermatológico de referencia nacional registró 60 casos de esporotricosis en personas provenientes de diferentes regiones del país [25]. Asimismo, otros autores, en un estudio retrospectivo de 11 años encontraron 142 (27%) casos de esporotricosis, confirmados por aislamiento del agente etiológico, en 512 pacientes remitidos por sospecha de la enfermedad [26].

Otras infecciones importantes en Colombia y otros países de América Latina son las conocidas micosis endémicas como la histoplasmosis y la paracoccidioidomicosis [27-29]. De acuerdo a una encuesta realizada en diferentes departamentos del país, durante 16 años, se notificaron 434 casos de histoplasmosis, de los cuales los pacientes infectados con el VIH fueron los más afectados [30]. Además, esta población también padece con frecuencia otra micosis importante en nuestro país, la criptococosis [31].

La epidemiología de las infecciones fúngicas invasivas y diseminadas es aún más desconocida en Colombia. Estudios aislados en diferentes instituciones muestran la importancia de algunas de estas micosis, como es el caso de la candidemia con cifras considerables en la incidencia y la prevalencia (2,3 casos/1.000 pacientes y 1,4%, respectivamente) [32]. Un estudio más reciente registró una mortalidad del 39,5% por candidemia en pacientes críticos no neutropénicos [33]. A pesar del impacto en la salud humana de la aspergilosis y de la fusariosis, en Colombia se carecen de estudios epidemiológicos sobre estas infecciones.

Dado el incremento de las diferentes micosis, así como la morbilidad y mortalidad asociada, la prevención, el diagnóstico y el tratamiento oportuno de este tipo de infecciones es una conducta ineludible; y, aunque se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico y diferentes fármacos antifúngicos, continúan siendo un reto para el clínico.

Las principales infecciones fúngicas y su etiología

Los hongos de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* continúan siendo los principales agentes etiológicos de las micosis invasivas y diseminadas. Sin embargo, especies de otros géneros han ido ganando importancia dentro de la micología médica debido a la incidencia y mortalidad que causan o a la baja sensibilidad o resistencia que presentan a uno o varios antifúngicos. En la [tabla 1](#) se indican los principales agentes causales de las micosis más importantes, así como las formas infecciosas del hongo, el mecanismo de infección, los principal(es) órgano(s) blanco, las estructuras que ayudan al diagnóstico y el tiempo que puede tardar la observación del hongo en el cultivo.

Micosis superficiales

Las micosis superficiales, es decir, aquellas que afectan la piel y anexos (pelo y las uñas), y las mucosas, son las más frecuentes y son causadas principalmente por los hongos del género *Malassezia* y del grupo de los dermatofitos (tiñas). Dentro de éstas, las infecciones de las uñas (onicomicosis) son las más comunes y, aunque se presentan en cualquier región del mundo, afectando aproximadamente el 25% de la población, la mayoría de los casos se registran en regiones tropicales [12].

Tabla I. Principales hongos patógenos humanos

Hongo	Fuente de la infección	Principal forma infecciosa	Modo de adquirir la infección	Sitio de infección más común	Principal estructura que se observa en el examen directo a partir de las muestras clínica	Tiempo aproximado de incubación del cultivo (días)
<i>Aspergillus</i> spp.	Ambiente	Conidias	Inhalación	Pulmones, ojos, uñas, oído	Hifas dicótomas	1-6
<i>Candida</i> spp.	Microbiota endógena	Blastoconidias	Invasión directa/ Diseminación	Mucosas intestinal, vaginal y oral, uñas, sangre	Blastoconidias, pseudohifas e hifas	1-2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Suelos contaminados con heces de aves (palomas)	Levaduras sin cápsula y basidiosporas	Inhalación	Meninges, pulmón y piel (por diseminación)	Blastoconidias encapsuladas	3
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Suelos contaminados con heces de murciélagos y de aves	Microconidias	Inhalación	Pulmón, médula ósea sangre, piel o mucosas (por diseminación)	Blastoconidias	10-30
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Suelo	Conidias y fragmentos de hifas	Inhalación/ trauma	Pulmón, piel o mucosas (por diseminación)	Blastoconidias multigemantes	10-45
Complejo <i>Sporothrix schenckii</i>	Suelo y plantas	Conidias y fragmentos de hifas	Trauma	Piel o tejido celular subcutáneo, articulaciones, pulmones y meninges	En algunos casos blastoconidias	3-12
Dermatofitos	Hombres y animales infectados, suelo	Conidias (artroconidias) e hifas	Contacto directo o con fómites infectados	Piel, cabello y uñas	Hifas	3-14
<i>Malassezia</i> spp.	Microbiota endógena	Blastoconidias e hifas	Directa a partir de la microbiota	Piel, cuero cabelludo, oído	Blastoconidias e hifas	3-7
<i>Fusarium</i> spp.	Suelo y plantas	Conidias y fragmentos de hifas	Inhalación/ trauma, diseminación a partir de infección en piel o uñas	Pulmón, ojos, uñas y sangre	Hifas (en algunos casos pueden ser dicótomas)	2-6
Mucorales	Suelo y plantas	Esporangiosporas	Inhalación o contaminación de heridas o quemaduras	Pulmón, piel, senos paranasales, ojos, oídos, sangre y piel (en pacientes quemados)	Hifas aseptadas	1-5

Los agentes causales de micosis superficiales más importantes son los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton interdigitale* (antes conocido como *Trichophyton mentagrophytes*), las levaduras del género *Candida* y algunos hongos filamentosos no dermatofitos, involucrados principalmente en casos de onicomicosis, como *Fusarium* spp., *Neoscytalidium* (antes denominado *Scytalidium*) *dimidiatum*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Scopulariopsis* spp. y *Acremonium* spp.

[35]. Estos últimos han mostrado un incremento importante y suelen ser resistentes a los tratamientos antifúngicos sistémicos, por lo que frecuentemente se asocian con falla terapéutica [36].

Micosis subcutáneas

Las micosis subcutáneas comprometen principalmente la piel y el tejido celular subcutáneo. En situaciones de inmunosupresión se pueden presentar casos de diseminación. La mayor incidencia se presenta en regiones tropicales. La esporotricosis (causada por especies del complejo *Sporothrix schenckii*), la cromoblastomicosis (causada por diversos agentes dematiáceos como *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* y *Cladophialophora carrionii*), los eumicetomas (causada por una variedad de hongos filamentosos, siendo *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea*, *Pseudallescheria boydii* y *Leptosphaeria senegalensis* los responsables de aproximadamente el 90% de los casos) y la lobomicosis (causada por *Lacazia loboi*), son las micosis subcutáneas más importantes [37-40].

Infecciones por levaduras

Las principales levaduras patógenas pertenecen a los géneros *Candida* y *Cryptococcus*. Dentro del género *Candida* se ha descrito un número importante de especies patógenas, a pesar de que forman parte de la microbiota de las mucosas y se pueden encontrar transitoriamente en la piel. En contraste, las especies de *Cryptococcus* spp., son levaduras ambientales y la infección se adquiere por inhalación. Además, en los últimos años, aunque en menor proporción, han aumentado los casos de infecciones por otras levaduras.

Candidiasis

El espectro de la candidiasis es amplio y abarca desde infecciones superficiales (orofaríngeas, vaginales y de la piel) hasta formas más severas como la candidiasis sistémica [2,3,41]. La candidiasis orofaríngea afecta el paladar duro y blando, la faringe, la lengua y la mucosa oral. Generalmente es uno de los primeros signos clínicos de la infección causada por el VIH [42]. La candidiasis vulvovaginal supone una de las enfermedades fúngicas más frecuentes y se estima que alrededor del 75% de las mujeres presentan al menos un episodio durante su vida. El incremento en la incidencia de este tipo de candidiasis se ha asociado al uso de antibióticos de amplio espectro y al aumento de pacientes inmunocomprometidos [43].

La mayoría de las infecciones diseminadas e invasivas (70% al 90%) están causadas por levaduras del género *Candida* [41]. La candidemia tiene una mortalidad asociada de alrededor del 40% al 50% dependiendo de la población afectada y de la especie implicada [3,41,44]. Globalmente, el Complejo *Candida albicans* (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis* y *Candida africana*) es el de mayor importancia clínica, ya que es el que se aísla con mayor frecuencia en los casos de candidiasis (45% al 50%) [45]. Generalmente, las infecciones superficiales causadas por esta levadura no son letales; sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos la diseminación se asocia a una alta mortalidad [6]. Los factores de riesgo más importantes para la candidiasis diseminada por *Candida albicans* son las alteraciones en la mucosa gastrointestinal, la presencia de catéteres venosos y el uso de antibióticos de amplio espectro [46].

En los últimos años, las especies de *Candida* no-*albicans* han aumentado su incidencia significativamente y suponen aproximadamente el 50% de todos los episodios de candidemia [44,47].

Entre estas especies se encuentran principalmente las del Complejo *Candida glabrata* (*Candida nivariensis* y *Candida bracarensis*) y aquellas del Complejo *Candida parapsilosis* (*Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*) y, en menor proporción, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. Aunque la mayoría de estas levaduras suelen ser menos virulentas que el Complejo *Candida albicans*, algunas son más resistentes a uno o varios antifúngicos o presentan tendencia a desarrollarla rápidamente [4,48].

Criptococosis

Las especies del género *Cryptococcus* son los agentes etiológicos de la criptococosis, una infección de distribución mundial que se adquiere por la inhalación de basidiosporas del ambiente. Las especies más frecuentes son *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, las cuales se diferencian en la epidemiología y los cuadros clínicos que producen. El hábitat natural de *Cryptococcus neoformans* es el suelo o la materia orgánica contaminada con guano de aves, mientras que el de *Cryptococcus gattii* se encuentra asociado con árboles de eucalipto [49]. A diferencia de *Cryptococcus neoformans*, que afecta especialmente individuos inmunocomprometidos, la infección por *Cryptococcus gattii* es más frecuente en individuos inmunocompetentes [50].

Otras levaduras y hongos levaduriformes

Levaduras menos frecuentes como *Rhodotorula* spp., *Pichia* spp. y *Saccharomyces cerevisiae*, así como hongos denominados levaduriformes (en inglés, *yeast-like*) como *Geotrichum capitatum* y *Trichosporon* spp., también tienen impacto en la salud humana. En concreto, las especies de *Trichosporon* forman parte de la microbiota de diferentes zonas del cuerpo humano y, aunque el porcentaje de casos de infección invasiva que producen no es muy elevado, son la segunda o tercer causa de fungemia, después de la producida por *Candida* spp. Los individuos más susceptibles a infecciones por *Trichosporon* spp., son los pacientes leucémicos, en los que se registra una tasa de mortalidad que oscila entre el 60% y el 80 %. El tratamiento de estas infecciones representa un reto terapéutico debido a su reducida sensibilidad a los principales antifúngicos de uso clínico [13,51].

Infecciones por hongos filamentosos

Actualmente los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Penicillium* y algunos del orden Mucorales (*Rhizopus oryzae*, *Mucor circinelloides*, *Rhizomucor pusillus* y *Lichteimia* (antes *Absidia*) *corymbifera*, son una causa importante de infecciones en el humano, principalmente del tipo invasivas, que si bien son menos frecuentes respecto a las producidas por levaduras, la mortalidad asociada suele ser mayor [52-54].

Aspergilosis

Las aspergilosis corresponde a la infección causada por las especies del género *Aspergillus*, que comprende desde cuadros alérgicos, como la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) o los aspergilomas (crecimiento del hongo dentro de una cavidad preexistente), hasta formas más graves, como la infección pulmonar o la aspergilosis invasiva [55]. *Aspergillus fumigatus* causa aproximadamente el 90% de los casos y es el agente causal más importante de enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos en pacientes neutropénicos y trasplantados (de

órganos sólidos o de progenitores hematopoyéticos). Otras especies como *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus lentulus* muestran una incidencia creciente en pacientes con factores predisponentes [55-59].

Otros hongos filamentosos

Las infecciones causadas por *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp. son menos frecuentes que las causadas por *Aspergillus* spp., pero suelen llegar a ser más graves por el tipo de pacientes que afectan y la baja sensibilidad o multiresistencia a los antifúngicos disponibles, lo que se correlaciona con la falta de respuesta clínica al tratamiento. Algunas especies del género *Fusarium* causan infecciones leves como la onicomicosis que pueden afectar cualquier individuo o severas y diseminadas que se presentan en pacientes con trastornos hematológicos, que reciben terapia citotóxica o trasplantados en tratamiento con corticosteroides [60]. Las especies de *Fusarium* suelen ser resistentes o poco sensibles a varios antimicóticos [61,62]. Algunas especies del orden Mucorales representan otro grupo de agentes de importancia clínica por la alta mortalidad que causan en pacientes con factores predisponentes como cáncer hematológico, neutropenia y monocitopenia, en tratamientos con altas dosis de corticosteroides, con hiperglicemias no controladas, diabetes, entre otros [63].

Micosis endémicas

Las micosis endémicas, aquellas que ocurren generalmente en regiones localizadas geográficamente, son producidas por los hongos dimórficos *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis/posadassi* [64-66], siendo los dos primeros de importancia en Colombia.

Finalmente, es importante referirnos a *Pneumocystis jirovecii*, un hongo con características particulares que lo diferencian de los antes descritos. Éste es un microorganismo oportunista con capacidad de causar neumonía en pacientes inmunocomprometidos, principalmente con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [67].

Diagnóstico clínico de las infecciones fúngicas

El diagnóstico adecuado de las infecciones fúngicas inicia por la sospecha clínica. Los síntomas y los signos de estas infecciones son variados y dependen del agente etiológico, la localización de la misma y el estado inmune del hospedero. En escasas ocasiones la historia personal y los hallazgos del examen físico son suficientes para establecer el diagnóstico de una infección fúngica [10,68]; no obstante, las infecciones fúngicas suelen confundirse con las producidas por bacterias, por lo que establecer el contexto en que se producen es lo que permite sospecharlas [68].

Una serie de datos clínicos, epidemiológicos y terapéuticos como el motivo de consulta, los antecedentes médicos y quirúrgicos, el uso de medicamentos, la procedencia y la historia de viajes a zonas endémicas de algunas enfermedades micóticas, pueden orientar al médico sobre una posible infección fúngica y a establecer un adecuado diagnóstico. Otros factores como la tenencia de mascotas o exposición a otros animales, la ocupación (p. ej. agricultura, caza, arqueología, espeleología, jardinería, construcciones, entre otros), a pesar de ser considerados menos importantes, son de ayuda, especialmente en los casos de micosis endémicas [68].

La presencia de enfermedades subyacentes como la diabetes mellitus descompensada, las neoplasias hematológicas, la fibrosis pulmonar, la enfermedad granulomatosa crónica y la infección por el VIH, al igual que la historia reciente de trasplante alogénico o tratamiento para la enfermedad injerto contra huésped y el tratamiento con agentes inmunosupresores como los corticosteroides, los agentes quimioterapéuticos para la terapia contra el cáncer y los antibióticos de amplio espectro, constituyen algunos de los principales factores de riesgo de la infección por hongos [12,63,69].

Durante el examen físico es importante realizar la exploración de la piel, los ojos, la nariz, la boca y la garganta, entre otras, en búsqueda de las lesiones referidas por el paciente o aquellas que puedan no haber sido notadas por éste previamente. De igual manera, se debe determinar si existen signos de presión intracraneal o neumonitis, y realizar la evaluación cardíaca y abdominal. Estos hallazgos si bien no son específicos pueden dar indicios de que se trata de una infección fúngica. No obstante, en la mayoría de los casos se requiere de exámenes de laboratorio que ayuden a establecer el diagnóstico [68].

Diagnóstico por el laboratorio de las infecciones fúngicas

La identificación precisa de los agentes causales es de fundamental importancia en el diagnóstico de una infección micótica desde el punto de vista ecológico, epidemiológico y terapéutico, dado que las rutas de infección, las diferencias en los regímenes terapéuticos y la susceptibilidad pueden variar entre las diferentes especies. Es por ello que disponer de pruebas diagnósticas específicas, sensibles, rápidas y confiables es una permanente preocupación en el campo de la micología médica [70,71].

El diagnóstico por imagenología, la observación de las estructuras micóticas (blastoconidias, hifas y pseudohifas) en muestras biológicas de los pacientes infectados y el cultivo de éstas en busca del aislamiento del agente causal y de su identificación, continúan siendo el estándar de referencia en el diagnóstico micológico a pesar de su limitada sensibilidad y especificidad, y de los avances en el desarrollo de técnicas rápidas con las que se pretende identificar el agente etiológico directamente de muestras clínicas [72].

El diagnóstico micológico por métodos convencionales no es fácil ya que depende del hospedero, la calidad de la muestra, el microorganismo y la experiencia de quien hace el diagnóstico. Muchos de los pacientes que padecen infecciones fúngicas se encuentran en serias condiciones de salud por lo que la obtención de las muestras, principalmente mediante procedimientos invasivos, puede estar contraindicada. De ahí que actualmente exista una tendencia al desarrollo y aplicación de métodos no invasivos y cultivo-independientes, entre los que se incluyen la detección de antígenos, anticuerpos y ADN fúngico por técnicas de biología molecular [72,73].

Tipo de muestras

El éxito en el aislamiento de los agentes etiológicos de las micosis puede depender de la recolección, el transporte, el procesamiento rápido y correcto de las muestras y de la inoculación en el medio de cultivo y a la temperatura de incubación adecuados. Las muestras para el diagnóstico micológi-

co deben estar correctamente identificadas y ser tomadas en condiciones asépticas, previo a la instauración de cualquier tratamiento antimicrobiano y luego de la suspensión de antifúngicos tópicos o sistémicos mínimo una semana previa a la toma de la muestra, evitando la contaminación ambiental o con la microbiota. Además, es indispensable que la recolección y el almacenaje de las muestras se haga en los recipientes estériles correspondientes según el tipo de muestra [74].

El tipo de muestra para el diagnóstico micológico se elige acuerdo a la sintomatología, el tipo de lesión y la sospecha clínica [11]. Para las lesiones en el cuero cabelludo se recomienda raspar escamas de piel y tomar trozos de pelo con raíz del sitio de la lesión utilizando pinzas estériles [75]. A partir de las lesiones con sospecha de onicomicosis se toman escamas de la parte más profunda de las zonas decoloradas o distróficas, y tanto de la superficie como de la base, la región subungueal y los bordes laterales de la uña [75].

En el caso de las lesiones en piel, se toman escamas del borde activo de la lesión, costras, vesículas o pústulas, utilizando un bisturí. De la misma manera se procede ante la sospecha de una micosis profunda con manifestaciones en piel o mucosas (úlceras, descarga sinusal, nódulos verrugosos o costrosos). En algunos casos es necesario acudir a la obtención de la muestra por biopsia. La citología, los hisopados o las biopsias son útiles para el diagnóstico de infecciones en la cavidad oral o mucosa vaginal. Por otro lado, las muestras de sangre, esputo, lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo, exudados de tejidos y orina son fundamentales, principalmente en el diagnóstico de las infecciones fúngicas invasivas, pulmonares y meningitis [76].

Los espécimen deben ser transportados y procesados, preferiblemente dentro de las dos horas después de la recolección. Los fragmentos de pelo y las escamas de piel pueden ser recogidos, almacenados y transportados en una hoja de papel doblada a temperatura ambiente. Los hisopados de mucosa se recogen en medios de transporte adecuados (p. ej. medio de Stuart o solución fisiológica estéril) cuando se sospecha una infección por *Candida* spp. Los demás especímenes pueden ser transportados en medios como caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI; del inglés *Brain Heart Infusion*). El uso de contenedores estériles a prueba de vertidos es recomendado para el transporte de las muestras [74,76].

Cuando se supone un retraso en el transporte o procesamiento de la muestra o la posible contaminación bacteriana se puede adicionar penicilina (20 U/mL), estreptomycin (1.000.000 µg/mL) o cloranfenicol (0,2 mg/mL) y almacenar bajo refrigeración a 4 °C máximo por 24 horas; a excepción de la sangre, la cual se debe mantener a temperatura ambiente o incubar a 35 °C. En el caso del líquido cefalorraquídeo el transporte debe ser a temperatura ambiente para que la viabilidad de microorganismos como *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* no se vea afectada [74,76].

Métodos convencionales para el diagnóstico de infecciones fúngicas

Evaluación microscópica directa de muestras biológicas

El examen directo de muestras biológicas es un procedimiento diagnóstico valioso que permite la observación de estructuras micóticas que sugieren una infección [76]. Las preparaciones para

el examen directo en fresco se realizan en un portaobjetos mediante la mezcla de una pequeña cantidad de muestra con solución salina, principalmente para muestra vaginales, o hidróxido de potasio (KOH) al 10%, el cual aclara la muestra permitiendo una mejor visualización de las estructuras fúngicas; sin embargo, requiere de la experiencia del observador, ya que en ocasiones pueden ser confundidas con artefactos [34]. La sensibilidad del examen directo se puede incrementar usando fluorocromos como el blanco de calcoflúor, el cual se une a la pared celular de los hongos emitiendo fluorescencia que puede ser detectada con un microscopio de fluorescencia [76,77] (véase figura 1).

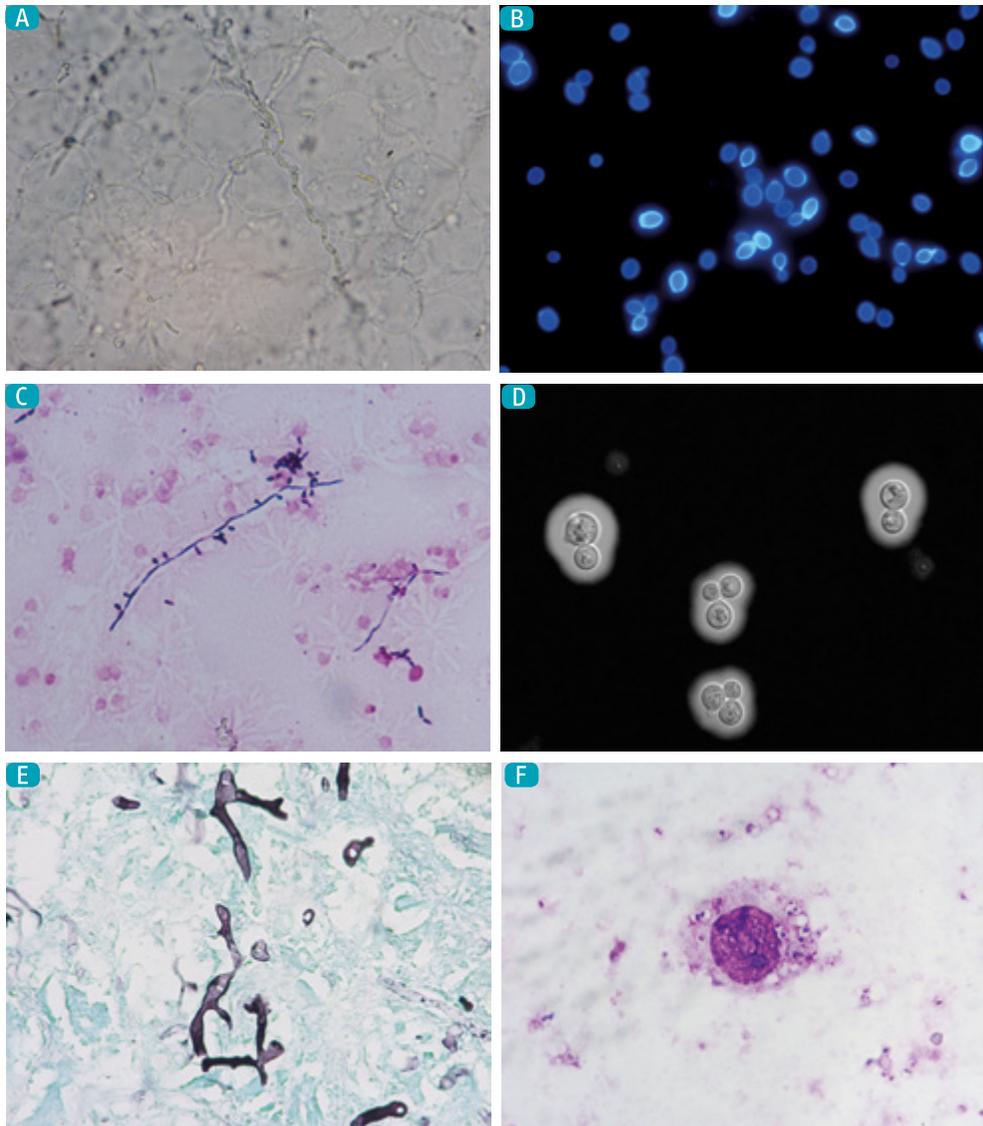


Figura 1. Métodos de evaluación microscópica directa de hongos a partir de muestras biológicas. **A.** Examen directo con KOH. **B.** Tinción con blanco de calcoflúor. **C.** Tinción de Gram. **D.** Examen directo con tinta china. **E.** Tinción con plata metenamina. **F.** Tinción de Wright. Cortesía de la Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia (**A, C, E y F**) y de las Dras. Cristina Rueda Hernández y Nuria Tevijano Contador, Instituto de Salud Carlos III, España (**B y D**).

En los exámenes directos las blastoconidias se observan como estructuras esféricas de diferentes tamaños y tipo de gemación. Por ejemplo, las blastoconidias de *Candida* spp. tienen un tamaño de 5 µm a 10 µm de diámetro y son unigemantes, mientras que las de *Paracoccidioides brasiliensis* varían entre 5 µm y 60 µm de diámetro y pueden ser multigemantes, en ocasiones tomando una forma descrita como «timón de barco» [34]. Las levaduras también pueden ser encapsuladas como las de *Cryptococcus* spp. (véase figura 1D).

Las hifas se observan como estructuras alargadas, ramificadas o no ramificadas, con presencia de abundantes septos (septadas) o con septos esporádicos (aseptadas), hialinas o dematiáceas (oscuras) según el tipo de hongo filamentoso involucrado en la infección [74]. Por ejemplo la observación de hifas septadas delgadas con ramificaciones dicotómica en ángulo de 45° sugiere la infección por *Aspergillus* spp., mientras que la presencia de hifas amplias, irregulares, sin septos o con septos esporádico, en forma de cinta y con ramificaciones en ángulo de 90° alude a la posibilidad de una infección por un hongo del orden Mucorales [34,76,77]. En algunas situaciones es factible la observación de blastoconidias e hifas o pseudohifas en la misma muestra, que sugieren la infección por *Candida albicans* [34,76]. Algunos de los principales hallazgos en los exámenes directos que sugieren la infección micótica se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de las principales estructuras observadas en las muestras de pacientes con infecciones fúngicas

Estructura	Hongo	Tamaño (diámetro, µm)	Descripción
Blastoconidias	<i>Histoplasma capsulatum</i>	2-5	Células pequeñas, de tamaño uniforme, oval o redondeada, con gemación única. Pueden formar acúmulos dentro de los macrófagos
	Complejo <i>Sporothrix schenckii</i>	2-6	Cuando se pueden observar son pequeñas, ovales o redondas, delgadas (en forma de cigarros), con gemación única y ocasionalmente múltiple
	<i>Cryptococcus</i> spp.	2-15	Células de tamaño variable, esféricas con gemación única o múltiple e inclusiones citoplasmáticas. Generalmente la cápsula es evidente o se insinúa desde el directo
	<i>Malassezia furfur</i> (en infecciones superficiales)	3-8 (blastoconidias) 2,5-4 (hifas)	Hifas cortas y blastoconidias redondas que forman acúmulos
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	8-15	De tamaño variable, gemación múltiple, con las nuevas células más pequeñas (2-5 µm) rodeando la células madre en la periferia, adquiriendo una forma semejante a un «timón de barco»
	<i>Candida</i> spp.	5-10	Células redondeadas, con gemación única, en ocasiones con pseudohifas o hifas dependiendo de la especie
Hifas aseptadas	Hongos del orden Mucorales	10-30	Hifas largas, irregulares, en forma de cinta, a menudo dobladas, pueden encontrarse septos ocasionales
Hifas septadas hialinas	Dermatofitos (en piel y uñas)	3-15	Hifas septadas hialinas, algunas ramificadas, en ocasiones con cadenas de arthroconidias
	Dermatofitos (en cabello)	3-15	<u>Infección ectótrix:</u> arthroconidias empaquetadas en la periferia del pelo <u>Infección endótrix:</u> arthroconidias formadas por la fragmentación de las hifas en el tallo del cabello
	<i>Aspergillus</i> spp.	3-12	Hifas septadas, de tamaño regular, con ramificación dicotómica en ángulo de 45°
	<i>Fusarium</i> spp.	3-12	Hifas septadas, de tamaño regular. En ocasiones se pueden observar hifas dicótomas

Hifas septadas dematiáceas	<i>Bipolaris</i> spp. <i>Cladophialophora</i> spp. <i>Curvularia</i> spp. <i>Exophiala</i> spp. <i>Phialophora</i> spp. <i>Hortaea werneckii</i>	2-6	Hifas dematiáceas polimórficas
Cuerpos escleróticos	<i>Cladophialophora carrionii</i> <i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Fonsecaea compacta</i> <i>Phialophora verrucosa</i> <i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	5-20	Estructuras color marrón, redondeadas o polimórficas, de pared gruesa con septos transversales, que contienen dos planos de fisión que forman una tétrada de células (células escleróticas de Medlar)
Gránulos (micetoma)	<i>Acremonium</i> spp. <i>Curvularia geniculata</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Exophiala jeanselmei</i> <i>Madurella grisea</i> <i>Madurella mycetomatis</i> <i>Pseudallescheria boydii</i>	200-300 65-160 200-500 300-600 500-1000 200-300 350-500 200-900 200-300	Gránulos suaves de color blanco Gránulos duros de color negro Gránulos suaves de color negro con vacuolas, formado por hifas oscuras Gránulos duros de color marrón a negro Gránulos suaves de color blanco, compuestos por hifas y células hinchadas en la periferia

Tomado y modificado de *Overview of Fungal Identification Methods and Strategies* (p. 719-720) en: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, por P.M. Tille, 2014, Misuri, Estados Unidos: Elsevier Mosby. Copyright © 2014 por Mosby, Inc. [34].

Las preparaciones también pueden ser teñidas con las coloraciones de Wright, Giemsa o Gram dependiendo del tipo de muestra; por ejemplo, la tinción de Gram, utilizada comúnmente para la detección de bacterias, es de ayuda diagnóstica en las infecciones micóticas de las mucosas oral o vaginal, donde los hongos se observan generalmente Gram positivos. Asimismo, las tinciones de Giemsa o Wright pueden facilitar la observación de levaduras intracelulares de *Histoplasma capsulatum* en extendidos de sangre, médula ósea o esputo [34,76]. El tratamiento con tinta china o nigrosina de las muestras de pacientes con sospecha de criptococosis, principalmente líquido cefalorraquídeo, facilitan la observación de las levaduras encapsuladas [76,77] (véase figura 1).

Por su parte, las preparaciones histopatológicas apoyan el diagnóstico de las infecciones fúngicas invasivas. Específicamente, la tinción con hematoxilina-eosina, además de permitir la identificación de levaduras y hongos filamentosos en tejido, ayuda a identificar la reacción inflamatoria en el hospedero como presencia de células gigantes multinucleadas, material necrótico, hemorragia y el fenómeno de Splendore-Höeppli. La plata metenamina (Gomori-Grocott) se considera de gran utilidad para la detección de hongos en tejido debido a que resalta la pared fúngica en color café o negro en medio del tejido que toma un color verde. Finalmente, el ácido peryódico de Schiff (PAS), dada la afinidad que tiene por los polisacáridos de la pared de los hongos, permite distinguir las hifas y las blastoconidias del tejido. Otras coloraciones más específicas como la de Fontana-Masson y la mucicarmín de Mayer son útiles en la identificación de melanina en la pared fúngica y de mucopolisacáridos capsulares, respectivamente [34,78].

La sensibilidad de la microscopía para el diagnóstico de la infección por hongos es baja y varía según el agente causal y la cantidad en que se encuentre, el tipo y la calidad de la muestra, y la preparación y experiencia del profesional del laboratorio encargado del análisis [79,80]. Por tal razón, es importante considerar que un examen microscópico negativo no excluye la infección micótica. Por otro lado, este examen no es específico debido a que algunas estructuras o artefactos pueden confundirse fácilmente con elementos fúngicos. Además, con estos métodos no es factible la identificación del agente causal [74].

Pruebas inmunológicas

Considerando la baja sensibilidad y especificidad de las técnicas convencionales (directos y cultivo) en el diagnóstico micológico, la detección de antígenos y anticuerpos se han incluido en la batería de pruebas para el diagnóstico de diferentes micosis.

Detección de anticuerpos

Históricamente las pruebas más utilizadas en el laboratorio de rutina para la detección de anticuerpos son la inmunodifusión doble de Ouchterlony, la fijación de complemento y los inmunoensayos enzimáticos (ELISA; del inglés, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) [81]. La prueba de inmunodifusión se basa en la difusión radial de los inmunoreactantes (antígenos y anticuerpos) en un gel de agar que, al encontrarse, forman un complejo antígeno-anticuerpo que se precipita en el gel y se visualiza como una línea blanquecina. Esta técnica se ha utilizado para el diagnóstico del aspergiloma, la aspergilosis pulmonar crónica, la aspergilosis broncopulmonar alérgica, la histoplasmosis, la paracoccidiodomicosis y la esporotricosis. Además, se ha empleado de forma exitosa en estudios epidemiológicos [82-84].

Por su parte, la prueba de fijación de complemento se basa en la capacidad del complemento para unirse a los complejos antígeno-anticuerpo, determinada por la lisis de eritrocitos. Esta prueba ha sido de utilidad en la detección de anticuerpos contra *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*; sin embargo, su uso de rutina es poco práctico debido a que es una técnica laboriosa. Una de las pruebas comerciales formato ELISA más conocida para la detección de anticuerpos es Platelia™ *Candida* Ab (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos), la cual detecta anticuerpos circulantes contra el manano de *Candida* spp. y es de ayuda en el diagnóstico de la candidemia y de la candidiasis invasiva [85,86].

La sensibilidad y especificidad de las pruebas que detectan anticuerpos son variables y la interpretación de los resultados se debe hacer con cuidado. Con el fin de mejorar estas pruebas se ha tratado de desarrollar otras con formato ELISA que utilizan antígenos purificados o recombinantes fúngicos para la detección de anticuerpos circulantes en el paciente, lo que puede disminuir o eliminar las reacciones cruzadas de las técnicas anteriores [82,87,88]. Otra desventaja de la detección de anticuerpos es que suele ser útil en pacientes inmunocompetentes, más no en los inmunocomprometidos [78,82,87,89].

Detección de antígenos (biomarcadores)

La detección y cuantificación de biomarcadores como el galactomanano, el cual hace parte de la pared celular fúngica principalmente de las especies de *Aspergillus*, y del 1,3-β-D-glucano,

presente en varios hongos patógenos (panfúngica) apoyan el diagnóstico de algunas infecciones fúngicas invasivas. Estos antígenos se pueden detectar en muestras clínicas como suero y lavado broncoalveolar [90]. Entre los estuches comerciales en el formato ELISA disponibles para la detección de estos antígenos se encuentran Platelia™ *Aspergillus* EIA (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos), Fungitell® β -D-Glucan Assay (Associates of Cape Cod Inc, Massachusetts, Estados Unidos) y Fungitec G Test MK (Seikagaku Biobusiness, Tokio, Japón). También se puede detectar el manano, un componente de la pared celular de *Candida* spp. (Platelia™ *Candida* Ag, Bio-Rad Laboratories) como ayuda en el diagnóstico de candidemia y candidiasis invasiva [85,86].

La sensibilidad y especificidad de estas pruebas son variables, presentan falsos positivos y requieren determinaciones seriadas, en algunos casos, para mejorar la sensibilidad [91,92]. Incluso, aún existen controversias con respecto a la utilidad diagnóstica de estas pruebas [72,93]. La detección del polisacárido de la cápsula de *Cryptococcus neoformans* por aglutinación con partículas de látex es una prueba ampliamente utilizada en el diagnóstico de la criptococosis, debido a su sensibilidad y especificidad tanto en muestras de líquido cefalorraquídeo como de suero (>90%) [94,95].

Recientemente se ha desarrollado una técnica para detectar antígenos de las especies de *Aspergillus* en suero y lavado broncoalveolar de pacientes con aspergilosis invasiva, el *Lateral Flow devices*, el cual corresponde a una inmunocromatografía en la que se utiliza un anticuerpo específico dirigido contra una glicoproteína extracelular, secretada por el hongo durante el crecimiento activo de la hifa [96]. Esta es una técnica rápida y sensible por lo que se le atribuye un alto valor diagnóstico, principalmente en los pacientes inmunocomprometidos con riesgo de desarrollar aspergilosis invasiva [97]. Además, se considera una técnica sencilla, de fácil manejo en el laboratorio de rutina, que no requiere personal especializado y con la que se obtienen resultados rápidos [98]. De igual manera, se han diseñado variaciones de esta técnica para la detección de un antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans* en suero y líquido cefalorraquídeo [81].

La detección de compuestos orgánicos volátiles (metabolitos secundarios) de *Aspergillus* spp., en el aire exhalado de los pacientes infectados, se plantea como una opción para el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar. Los metabolitos se detectan usando la técnica de cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas o las narices electrónicas (del inglés, *electronic noses*). La sensibilidad y especificidad de las pruebas se calculó entre el 83,3% y el 100%, y entre el 94% y el 93,3%, respectivamente [99,100]. A pesar de lo prometedor que parecen ser los resultados de las técnicas, es necesario llevar a cabo estudios posteriores con el fin de evaluar la influencia que pueden tener factores como el tratamiento con antimicóticos u otros medicamentos, o la presencia de otros microorganismos en los resultados para definir el valor diagnóstico real de las mismas. Además, es importante analizar el costo-efectividad de esta prueba [93,101].

Identificación del agente causal

La identificación precisa del agente causal de una infección micótica (en lo posible hasta género y especie) tiene gran importancia en términos de la predicción del curso de la infección, el órgano blanco y la susceptibilidad antifúngica [72]. El método convencional y de referencia,

hasta el momento, para la identificación fúngica se basa en el aislamiento del hongo *in vitro* a partir de muestras biológicas [80]. Otros criterios bioquímicos y fisiológicos, así como la termotolerancia y el dimorfismo, suelen complementar la identificación [34,76]. A continuación se hará alusión al procedimiento básico a seguir para el cultivo de muestras de pacientes con sospecha de una micosis.

Cultivo de muestras biológicas para el aislamiento de hongos patógenos

Dado que los requerimientos de cada hongo para su crecimiento son diferentes, las muestras clínicas deben ser cultivadas en varios medios sólidos. Los más utilizados son el Agar Sabouraud Dextrosa y el Agar Papa Dextrosa (PDA), los cuales permiten la recuperación primaria de hongos patógenos no exigentes y favorecen la esporulación. Otro medio utilizado es el Agar Micosel, el cual contiene cicloheximida y cloranfenicol para inhibir el crecimiento de hongos ambientales y de bacterias, respectivamente. El agar infusión de cerebro y corazón (BHI), al ser un medio no selectivo, permite el crecimiento de la mayoría de los hongos clínicamente relevantes [76]. En el caso de sospecha de enfermedad fúngica invasiva es común el uso de hemocultivos en botellas bifásicas con BHI para los cuales se cuenta actualmente con sistemas automatizados, principalmente para la detección de levaduras, como el sistema BACTECTM (Becton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos), BacT/ALERT® (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y VersaTREK® (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Otros medios, como los agares cromogénicos diferenciales permiten, además del aislamiento de las levaduras, la identificación presuntiva de algunas de las especies de *Candida* y de otras levaduras, que se pueden encontrar únicas o de forma simultánea en una misma muestra. El fundamento de estos medios se basa en la inclusión de sustratos que, ante la presencia de una actividad enzimática específica, produce un color determinado dependiendo de la levadura aislada. En la práctica clínica estos medios se utilizan principalmente para identificar la presencia de levaduras en muestras de orina [34,72,74], siendo el más utilizado de ellos el CHROMagar™ (BD, Carolina del Norte, Estados Unidos). En ciertas situaciones, puede estar indicada la utilización de medios específicos para el aislamiento de determinados hongos como *Malassezia* spp. (p. ej. agar Dixon), *Cryptococcus* spp. (p. ej. Agar con L-Dopa o Agar semilla de girasol) u hongos dimórficos patógenos primarios (p. ej. BHI), al igual que medios de cultivo diferenciales o que induzcan la esporulación (p. ej. agar arroz o el PDA) [34,74].

Para la realización del cultivo a partir de muestras superficiales se recomienda realizar entre ocho y 12 sitios de siembra con un bisturí o un asa micológica haciendo incisiones sobre el agar. Las muestras de tejido deben ser procesadas (maceradas, cortadas o digeridas) y las de líquidos estériles concentradas por centrifugación antes de ser cultivadas; luego, se adiciona al menos 1 mL de la muestra y se esparce por toda la superficie del medio de cultivo. Las muestras de médula ósea se depositan directamente en el medio de cultivo. Las muestras de orina deben ser procesadas y cultivadas inmediatamente después de la recolección (se suele cultivar el sedimento obtenido por centrifugación) [34]. Las muestras procedentes del sistema respiratorio (esputo o lavado broncoalveolar) deben ser digeridas para eliminar los detritos [11] y proce-

der a cultivarlas por siembra bacteriológica o siembra cuantitativa, como se indica para las muestras de orina.

En la **tabla 3** se indican los hongos patógenos más frecuentemente aislados de los diferentes tipos de muestras clínicas

Teniendo en cuenta la variación en la temperatura óptima de crecimiento de los hongos patógenos se recomienda incubar los cultivos a 25 °C-30 °C y a 37 °C durante varias semanas (generalmente entre cuatro y seis, incluso hasta por 12) [11,76]. Los cultivos no se deben descartar sin completar el período de incubación, aun cuando ya se haya aislado un posible patógeno, ya que puede tratarse de un contaminante que impide el crecimiento del verdadero agente causal. La interpretación del resultado de los cultivos siempre se debe basar en el cuadro clínico del paciente. El aislamiento de un hongo patógeno primario en muestras estériles (p. ej. biopsias, líquido cefalorraquídeo y otros líquidos biológicos) se considera siempre de valor diagnóstico. Por el contrario, el aislamiento en muestras de esputo y lavado broncoalveolar siempre plantea una gran dificultad de interpretación debido a la alta contaminación de la muestra, por ejemplo, *Candida* spp., al ser parte de la microbiota del tracto respiratorio se considera que no es el agente causal de infecciones respiratorias a pesar de ser aislada en el cultivo [34,74].

La mayoría de los hongos oportunistas son ubicuos, por tanto, la interpretación de un cultivo positivo debe considerar la posible contaminación en el sitio de la toma de las muestras, durante el transporte de las muestras o debido a la manipulación de la muestra en el laboratorio de microbiología.

Por esto, la presencia de hifas en el examen directo de la muestra, el crecimiento de colonias con las mismas características en diferentes medios, en los sitios de inoculación y a partir de muestras del mismo paciente tomadas en diferentes momentos, así como el crecimiento del microorganismo a 35 °C - 37 °C (si la sospecha es de una infección invasiva o diseminada), sugiere una infección fúngica [77].

Tabla 3. Hongos frecuentemente aislados a partir de muestras clínicas

Muestra	Hongos
Sangre	Complejo <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i> Complejo <i>Candida parapsilosis</i> <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Candida lusitanae</i> <i>Candida kefyr</i>
Líquido cefalorraquídeo	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Tracto genito-urinario	Complejo <i>Candida albicans</i> Complejo <i>Candida glabrata</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida krusei</i> <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Saccharomyces</i> spp. <i>Histoplasma capsulatum</i>
Tracto respiratorio	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Cladophialophora</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. Mucorales (poco frecuente)
Piel superficial y anexos (uñas y pelo)	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton interdigitale</i> (mentagrophytes) Complejo <i>Candida albicans</i> <i>Epydermophyton floccosum</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Malassezia</i> spp. <i>Microsporum canis</i> <i>Microsporum gypseum</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
Piel y tejido celular subcutáneo	Complejo <i>Sporothrix schenckii</i> <i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Alternaria</i> spp. <i>Acremonium</i> spp. <i>Phialophora</i> spp. <i>Basidiobolus</i> spp. <i>Conidiobolus</i> spp. <i>Curvularia</i> spp. <i>Exophiala</i> spp. <i>Pseudallescheria boydii</i> <i>Rhinocladiella aquaspersa</i> Mucorales (poco frecuente)

Tomado y modificado de *Overview of Fungal Identification Methods and Strategies* (p. 726) en: Bailey & Scott's *Diagnostic Microbiology*, por P.M. Jille, 2014, Misuri, Estados Unidos: Elsevier Mosby. Copyright © 2014 por Mosby, Inc. [34]

La identificación del hongo se realiza mediante la determinación de las características macroscópicas de las colonias en el cultivo como es el color (del anverso y el reverso), la forma (p. ej. rugosa o lisa) y la textura (p. ej. algodonosa, aterciopelada, glabra, cremosa, viscosa o pastosa) (véase figura 2) [34]. El tiempo de crecimiento es un factor que puede dar indicios del tipo de hongo aislado. Por ejemplo, un crecimiento entre 24 h y 48 h de incubación probablemente corresponde a una levadura. Entretanto, el tiempo de crecimiento y esporulación de los hongos filamentosos es variable y puede comprender desde uno o dos días, tal como sucede con los del orden Mucorales, hasta dos semanas en el caso de los dermatofitos, otros hongos hialinos y los hongos dematiáceos, o hasta cuatro como sucede con *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* [34,76] (véase tabla 4).

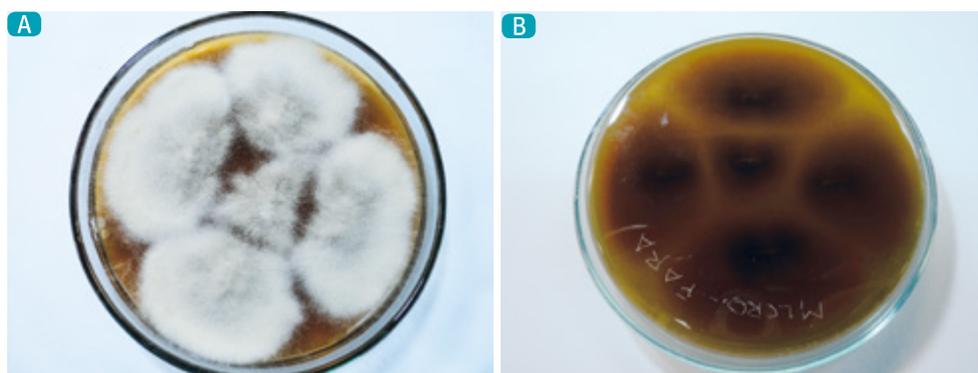


Figura 2. Apariencia de las colonias de un cultivo de *Fusarium* spp. en el anverso (A) y el reverso (B). Obsérvese la textura, la forma y el pigmento de la colonia. Cortesía de la Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Posterior al crecimiento visible del hongo en el cultivo se determinan sus características microscópicas. Para esto, se realizan preparaciones en un portaobjetos mezclando una gota de azul de lactofenol con una porción de las colonias tomada con cinta transparente o mediante pequeños cortes con bisturí o asa micológica en el borde de crecimiento de las colonias [34]. La observación microscópica permite la identificación del hongo mediante la detección de las estructuras características como blastoconidias, hifas, pseudohifas, artroconidias, algunas estructuras especializadas como conidias (macro y micro), células conidiógenas, clamidoconidias, esporangias y esporangióforos, ascas, ascosporas y picnidios [11,34,102] (véanse tabla 4 y figura 3).

La identificación a partir de un cultivo puede complementarse evaluando la termotolerancia, definida como la capacidad de un microorganismo para crecer a temperaturas mayores de 35 °C, lo que representa una ventaja selectiva para adaptarse al ambiente del hospedero y causar infección [103-106]. Para confirmar la termotolerancia de un hongo se realizan varios cultivos que se incuban a diferentes temperaturas (p. ej. 25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C y 42 °C) y se va observando periódicamente su crecimiento, el cual en caso de presentarse indica la capacidad de adaptación del hongo y de soportar la temperatura fisiológica humana o superior, como en los casos de fiebre y, por lo tanto, de ser patógeno.

Tabla 4. Principales características macroscópicas y microscópicas de los hongos patógenos más importantes

Morfología de la colonia	Morfología microscópica	Posible hongo (género)
Colonias de aspecto liso, cremoso, viscoso o pastoso	Blastoconidias y pseudohifas	Candida
	Blastoconidias solas	Candida (principalmente <i>Candida glabrata</i>) Cryptococcus Malassezia Saccharomyces
Colonias de superficie blanco, crema o gris claro, reverso no pigmentado	Hifas y artroconidias	Geotrichum Trichosporon
	Microconidias con o sin macroconidias	Dermatofitos: Epidermophyton Microsporum Trichophyton Ambientales: Acremonium Fusarium Pseudallescheria Scedosporium
	Con esporangias o esporangiolas	Rhizopus Mucor Absidia Cunninghamella Rhizomucor Syncephalastrum
	Con artroconidias	Geotrichum Coccidioides
Colonias de superficie blanca, crema, beige o gris claro y reverso amarillo, naranja o rojizo	Hifas con clamidoconidias	Dermatofitos: Epidermophyton Microsporum Trichophyton
	Hifas y conidias	Dermatofitos: Microsporum Trichophyton Ambientales: Acremonium
Colonias de superficie crema, blanco, beige o gris claro, con reverso rojo y violeta	Hifas y conidias	Dermatofitos: Microsporum Trichophyton Ambientales: Penicillium
Colonias de superficie crema, blanco, beige o gris claro, con reverso marrón	Hifas y conidias	Dermatofitos: Microsporum Trichophyton Ambientales: Madurella Scopulariopsis
Colonias de superficie crema, blanco, beige o gris claro, con reverso negro	Hifas y conidias	Ambientales: Nigrospora Phoma Pseudallescheria Scedosporium

Colonias de superficie marrón	Microconidias	<u>Dermatofitos:</u> <i>Trichophyton</i> <u>Ambientales:</u> <i>Aspergillus</i> <i>Cladophialophora</i> <i>Phialophora</i>
	Macronidias	<u>Dermatofitos:</u> <i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Trichophyton</i> <u>Ambientales:</u> <i>Alternaria</i> <i>Bipolaris</i> <i>Botrytis</i> <i>Curvularia</i>
	Esporangias	<i>Rhizomucor</i> <i>Rhizopus</i>
Colonias de superficie amarilla a naranja	Hifas y conidias	<u>Dermatofitos:</u> <i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Trichophyton</i> <u>Ambientales:</u> <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Sepedonium</i> <i>Verticillium</i>
Colonias de superficie rosa a violeta	Hifas y conidias	<u>Dermatofitos:</u> <i>Microsporum</i> <i>Trichophyton</i> <u>Ambientales:</u> <i>Acremonium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Verticillium</i>
Colonias de superficie verde y reverso claro	Hifas y conidias	<u>Ambientales:</u> <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Trichoderma</i> (contaminante) <i>Verticillium</i>
Colonias de superficie gris a negra, reverso claro	Hifas y conidias	<i>Aspergillus</i>
	Esporangióforos con merosporangias alrededor de la vesícula	<i>Syncephalastrum</i>
Colonias de superficie verde, gris oscuro o negro; reverso oscuro	Conidias pequeñas	<i>Cladosporium/</i> <i>Cladophialophora</i> <i>Exophiala</i> <i>Fonsecaea</i> <i>Phialophora</i> <i>Pseudallescheria</i> <i>Scedosporium</i>
	Conidias grandes	<i>Bipolaris</i> <i>Curvularia</i> <i>Nigrospora</i> <i>Ulocladium</i>
	Solo hifas con o sin clamidoconidias	<i>Hortaea</i> <i>Madurella</i>

Colonias blancas, de crecimiento lento y micelio corto	Hifas, microconidias y macroconidias tuberculadas	<i>Histoplasma</i>
	Microconidias pedunculadas	<i>Paracoccidioides</i>
Colonias con aspecto amugado blancas, crema, marrón, negras o combinadas	Hifas delgadas y conidias ovoides emergiendo de forma simpodial alrededor del extremo de un conidióforo (semejando una margarita)	<i>Sporothrix</i>

Tomado y modificado de *Overview of Fungal Identification Methods and Strategies* (p. 711-712) en: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, por P.M. Tille, 2014, Misuri, Estados Unidos: Elsevier Mosby. Copyright © 2014 por Mosby, Inc. [34].

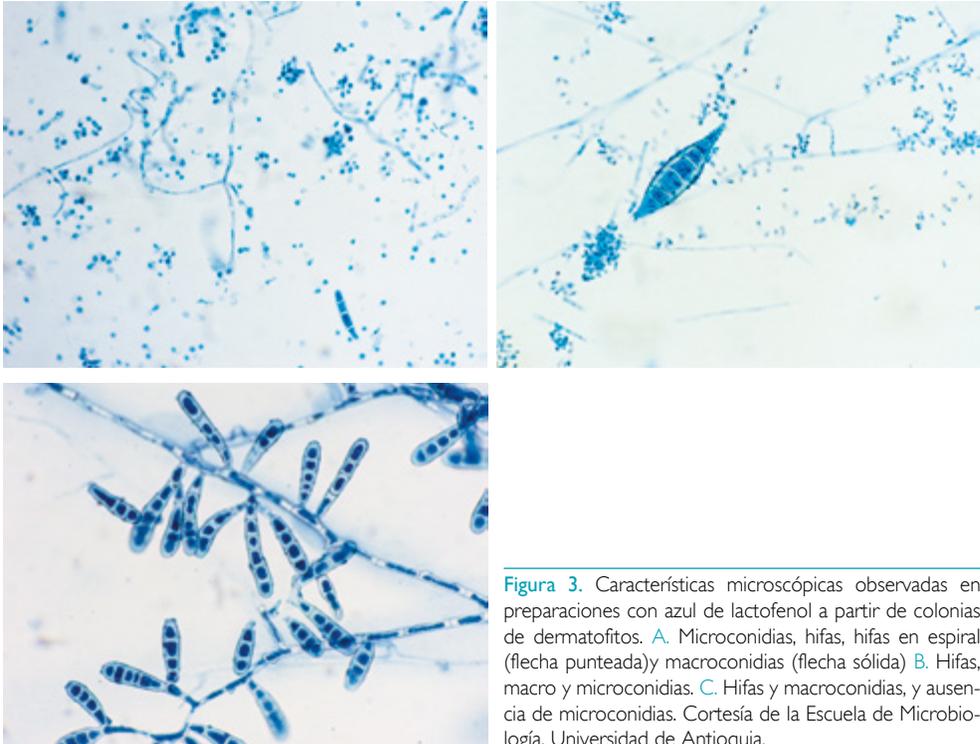


Figura 3. Características microscópicas observadas en preparaciones con azul de lactofenol a partir de colonias de dermatofitos. **A.** Microconidias, hifas, hifas en espiral (flecha punteada) y macroconidias (flecha sólida) **B.** Hifas, macro y microconidias. **C.** Hifas y macroconidias, y ausencia de microconidias. Cortesía de la Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

Otro factor que puede ayudar en la identificación de un hongo es el dimorfismo. Este es un factor de virulencia presente en algunos hongos, que consiste en la capacidad de transformarse de una forma micelial a la de levadura en respuesta a cambios de temperatura, nutrientes o concentración de dióxido de carbono, lo que facilita la supervivencia en los tejidos del hospedero. Algunas de las especies fúngicas que tienen esta cualidad son *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y las especies del complejo *Sporothrix schenckii*. Estos hongos se encuentran en el ambiente en su forma micelial y pueden ser aislados en esta misma forma en cultivos incubados a una temperatura entre 25 °C y 30 °C. La reversión a la forma de levadura ocurre, generalmente, en cultivos incubados a una temperatura de 35 °C, en medios como el agar infusión de cerebro y corazón (BHI) o el agar sangre, en presencia de CO₂, condiciones que pueden semejar a las encontradas en el hospedero [107].

Las pruebas bioquímicas como la asimilación de carbono o de nitrógeno y la fermentación de carbohidratos también pueden apoyar la información de un microorganismo aislado. La

capacidad de un microorganismo para utilizar o no un sustrato es revelada por el cambio de color en el medio, por la producción de gas o por turbidez [108]. Estas pruebas se encuentran disponibles como estuches comerciales (p. ej. el API 20 C de BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) o en dispositivos automatizados (p. ej. sistema VITEK®, BioMérieux) para evaluar las propiedades mencionadas en levaduras [72]. Otras pruebas como la inducción de la formación del tubo germinal y la formación de clamidosporas en agar arroz ayudan a la identificación de algunas especies de *Candida* [72].

No obstante, las características fenotípicas referidas pueden verse afectadas por factores inherentes a cada hongo como es el crecimiento lento de algunos de ellos, los requerimientos nutricionales que impiden el crecimiento en los medios convencionales y la termotolerancia, entre otros. En algunos casos no se logra fácilmente la observación de las estructuras características debido a la dificultad para lograr la esporulación del hongo. Además, entre especies o incluso entre géneros de algunos hongos existe una estrecha similitud morfológica que hace difícil su identificación. Un ejemplo de ello se presenta con el hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* que comparte características macroscópicas y microscópicas con hongos ambientales que, además de ser contaminantes, pueden ser patógenos, como es el caso de *Chrysosporium* spp. y *Sepedonium* spp. [102].

Un inconveniente adicional en la identificación de hongos de importancia médica es el cambio en el panorama epidemiológico de estas infecciones, puesto que han emergido hongos que no se habían reconocido como patógenos humanos [109]. Además, a la fecha, algunos hongos como *Lacazia loboi* y *Pneumocystis jirovecii* no se han logrado cultivar en el laboratorio [110,111].

Métodos moleculares para la identificación de hongos de importancia médica

En la lucha contra las enfermedades infecciosas, la microbiología clínica ha requerido optimizar a nivel de especificidad, sensibilidad, rapidez y confianza las pruebas diagnósticas para contribuir a la prevención, el control y al tratamiento de estas enfermedades. Con el fin de obviar las limitaciones de los exámenes directos, las coloraciones y las pruebas antigénicas, y como alternativa a la identificación de aislamientos fúngicos por características fenotípicas, se han desarrollado diferentes métodos moleculares que han permitido el acceso a secuencias de ADN y a los perfiles proteicos del hongo, siendo posiblemente más promisorias en cuanto a sensibilidad y especificidad.

Entre las técnicas moleculares utilizadas en la identificación de hongos se han descrito: el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP; del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE; del inglés, *Multilocus Enzyme Electrophoresis*), el uso de sondas de hibridación marcadas para la identificación de un fragmento específico de ADN (hibridación Southern o Southern blot) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) y sus modificaciones, para la amplificación de diferentes fragmentos de ADN específicos [112,113].

La amplificación de dianas acoplada a la secuenciación de los productos amplificados ha permitido una identificación más precisa de diferentes hongos, tanto directamente de

muestras clínicas como a partir de cultivos [114]. En la última década, diferentes trabajos han mostrado la utilidad del MALDI-TOF (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight*) para la identificación de hongos a partir de muestras clínicas y de cultivos [115]. A continuación nos referiremos brevemente a las técnicas moleculares más utilizadas en el diagnóstico micológico como son las basadas en el formato PCR y la tecnología MALDI-TOF.

Detección del ADN fúngico por reacción en cadena de la polimerasa

Entre las nuevas aplicaciones para la identificación de hongos a partir de muestras clínicas se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Inicialmente se utilizó el formato convencional de esta técnica para amplificar un solo fragmento específico de ADN. Las dienas más utilizadas con este propósito corresponden a secuencias o fragmentos de genes que codifican para la actina, la calmodulina, la β -tubulina, los genes ribosomales 5.8S, 18S y 28S, el factor de elongación I- α y las regiones no codificantes ITS1 e ITS2 (del inglés, *Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosomal. Estas técnicas sirven tanto para identificar hongos a partir de muestras clínicas (suero, sangre o muestra de tejido embebidas en parafina) como de cultivos [53,112,116,117]. En la [figura 4](#) se muestra el producto de la amplificación de las secuencias ITS de cuatro hongos filamentosos separados por electroforesis en un gel de agarosa.

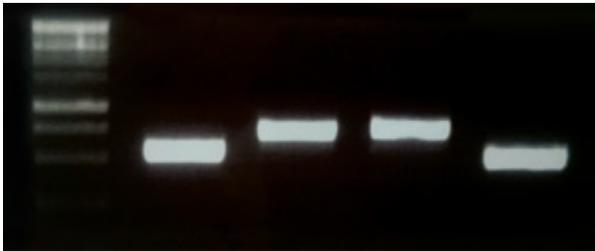


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa en el que se observan los productos de amplificación de secuencias ITS obtenidas a partir del ADN de cuatro hongos filamentosos (Carriles 2, 3, 4 y 5). Marcador de peso molecular (Carril 1). Cortesía del Laboratorio de Micología, Instituto de Salud Carlos III, España.

La reacción en cadena de la polimerasa a pesar de ser sensible presenta desventajas para su implementación en la práctica clínica debido a los falsos positivos, a que no es una técnica cuantitativa y a que la obtención del ADN a partir de las muestras clínicas es complicada y el rendimiento es variable [118]. Tratando de superar a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional diferentes variaciones han sido introducidas dando como resultado técnicas como la PCR-ELISA, la PCR anidada y la PCR cuantitativa, conocida también como PCR en tiempo real. En esta última variación la cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo es proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando, el cual es indicativo de la carga fúngica [118]. En numerosos estudios se ha utilizado este método con fines diagnósticos de las infecciones fúngicas a partir de diferentes muestras clínicas [118-123]. La PCR en tiempo real es más robusta, específica y sensible que la PCR convencional; además, demanda menos cantidad de ADN en las muestras [118,121].

Una variación de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa es la PCR en tiempo real multiplex, la cual puede detectar de forma simultánea múltiples fragmentos de ADN en una sola reacción, reduciendo el tiempo de obtención de resultados y los costos. Además, la varia-

ción de secuencias dentro de los productos amplificados puede permitir la identificación precisa de los hongos a nivel de especie [118,124]. Esta prueba ha sido utilizada para la detección de varios hongos en muestras de sangre y suero [118,125]. Recientemente se ha desarrollado un nuevo método automatizado para la identificación de hongos patógenos a partir de diferentes muestras biológicas basado en la tecnología Luminex® xMAP® (Luminex Corporation, Texas, Estados Unidos), utilizando perlas de microesferas recubiertas en su superficie con diferentes sondas de hibridación específicas de hongos que van a capturar el ADN con la secuencia complementaria de interés y va a ser detectado mediante fluorescencia. Esta tecnología permite el análisis de más de 100 secuencias dianas diferentes en cada pozo de reacción, a partir de una sola muestra y en un solo ensayo [126].

Aunque el diagnóstico basado en la PCR supera las limitaciones de otros métodos diagnósticos, aún presenta algunos inconvenientes que evitan que sea implementada en los laboratorios de diagnóstico micológico de rutina. La principal desventaja señalada es la falta de estandarización de las metodologías, lo que explica la variación de los resultados entre los laboratorios, afectando la reproducibilidad de los mismos. Además, se carece de pruebas comerciales estándar para su uso [72,127].

Secuenciación de ácidos nucleicos fúngicos

El creciente progreso en la tecnología y la disponibilidad de las secuencias del genoma completo de muchos hongos ha facilitado que métodos basados en las secuencias del ADN tengan aplicación tanto en investigación como en el campo de la microbiología clínica para la identificación de diferentes microorganismos. La identificación se logra comparando la secuencia del producto de amplificación obtenida a partir de la muestra o cultivo con una base de datos de secuencias de especies conocidas. La secuenciación es un método rápido (puede lograrse con 24 horas de crecimiento del hongo), económico y específico, por lo que se considera candidato para convertirse en el estándar de referencia para la identificación de hongos [128,129].

En la [figura 5](#) se presenta el cromatograma de la secuencia de un fragmento de ITS fúngico. Los picos del cromatograma son el resultado de la detección y el registro de la fluorescencia indicativo de la presencia de cada nucleótido.

Detección de proteínas fúngicas por MALDI-TOF

En la última década la espectrometría de masas MALDI-TOF ha sido introducida en el campo de la microbiología para la identificación de diferentes microorganismos. Esta técnica permite la obtención de una huella peptídica, resultado de la ionización suave de las proteínas ribosomales. Los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, dando como resultado un espectro que se puede comparar con una base de datos de espectros de referencia para lograr la identificación [130] (véase [figura 6](#)). La identificación puede hacerse directamente a partir de las muestras clínicas o de los aislamientos fúngicos *in vitro*. La técnica es calificada por diferentes investigadores como una técnica de fácil implementación, confiable, rápida, precisa y costo-efectiva para la identificación de levaduras y hongos filamentosos de importancia médica [131-135].

La comparación de la identificación de diferentes hongos filamentosos por cultivo y por MALDI-TOF ha demostrado que mientras el método convencional puede identificar correctamente

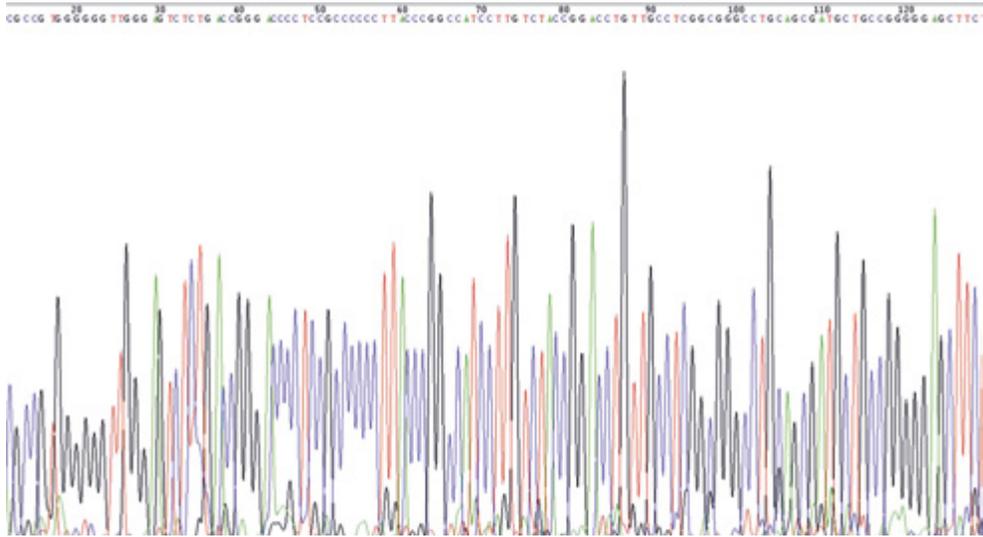


Figura 5. Cromatograma de la secuencia de un fragmento de ITS de *Histoplasma capsulatum*. Cada pico y color corresponde a un nucleótido: timina (rojo), adenina (verde), citosina (azul), guanina (negro). En la parte superior se especifica la secuencia que posteriormente se compara con las depositadas en un banco de datos de secuencias (GenBank) para la identificación del microorganismo de interés. Cortesía de la Dra. María José Buitrago, Instituto de Salud Carlos III. España.

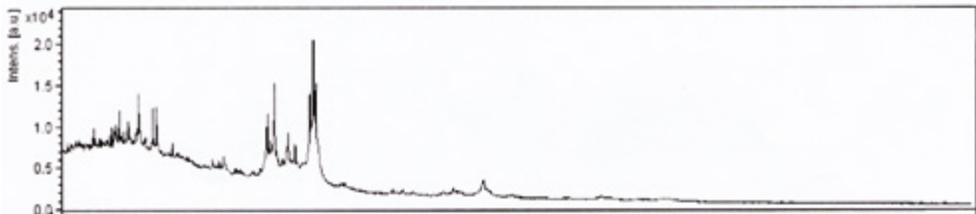


Figura 6. Espectro de proteínas de la forma micelial de *Histoplasma capsulatum* obtenido por MALDI-TOF. Cortesía de la Dra. María José Buitrago, Instituto de Salud Carlos III. España.

el 61,5% de los aislamientos con el MALDI-TOF se pueden identificar hasta el 89% [136]. Por otro lado, se ha demostrado que existe una diferencia importante en el tiempo que toma identificar levaduras utilizando los métodos tradicionales (aproximadamente 48 h) en comparación con la espectrometría de masas MALDI-TOF (menos de 1 h). Además, se ha calculado que el costo de la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF está por debajo de 1,35 € (aproximadamente \$ 5. 000 COP) [137].

Consideraciones finales

Finalmente, con la [tabla 5](#) y la [figura 7](#) pretendemos resaltar la información más relevante presentada en esta revisión. En la [tabla 5](#) se presentan los principales métodos disponibles actualmente para el diagnóstico por el laboratorio de las infecciones fúngicas, incluyendo los métodos convencionales y las nuevas alternativas. Asimismo, en la [figura 7](#) se presenta de manera general, la conducta a seguir en el laboratorio para el diagnóstico de una infección micótica a partir de diferentes muestras clínicas y los principales métodos empleados en cada caso.

Tabla 5. Principales métodos para diagnóstico micológico a partir de muestras biológicas

Método	Ejemplo	Principal uso
Evaluación microscópica directa		
Frescos	Solución salina	Observación de blastoconidias, hifas o pseudohifas en flujo vaginal
	Hidróxido de potasio (KOH) al 10%	Observación de blastoconidias, pseudohifas, hifas septadas, aseptadas, hialinas o dematiáceas, blastoconidias multigemantes de <i>Paracoccidioides</i> spp., células escleróticas de Medlar
Tinciones	Gram	Observación de blastoconidias, hifas o pseudohifas de <i>Candida</i> spp., principalmente en orina, flujo vaginal y mucosa oral
	Wright/Giemsa	Observación de blastoconidias, hifas o pseudohifas, principalmente en sangre periférica y médula ósea. Ampliamente utilizada para observar levaduras intracelulares de <i>Histoplasma capsulatum</i>
	Tinta China	Detección levaduras capsuladas de <i>Cryptococcus neoformans</i> , principalmente en líquido cefalorraquídeo
	Blanco de calcoflúor	Detección de blastoconidias, hifas o pseudohifas por microscopía de fluorescencia
	Hematoxilina-Eosina	Observación de hifas, pseudohifas, blastoconidias y cuerpos asteroides en tejido así como la respuesta inflamatoria del hospedero
	Ácido peryódico de Schiff (PAS)/ Plata metenamina de Gomori-Grocott	Diferenciación de hifas, pseudohifas y blastoconidias en tejido
	Fontana-Masson	Detección de melanina o pigmentos similares principalmente en hongos dematiáceos y <i>Cryptococcus</i> spp.
	Mucicarmin de Mayer	Detección de mucopolisacáridos capsulares p. ej. en <i>Cryptococcus neoformans</i>
Cultivo		
Medios de aislamiento	Agar Sabouraud dextrosa	Aislamiento primario de hongos ambientales y patógenos a partir de muestras clínicas
	Agar Micosel	Aislamiento primario de hongos patógenos, principalmente dermatofitos, a partir de muestras clínicas. Inhibe el crecimiento de bacterias y hongos ambientales contaminantes
	Infusión de cerebro y corazón (BHI)	Medio rico utilizado principalmente para la recuperación primaria de hongos ambientales y patógenos de difícil crecimiento. Además, para confirmar dimorfismo en hongos del complejo <i>Sporothrix schenckii</i> o <i>Histoplasma capsulatum</i>
	Medio bifásico con BHI (hemo-cultivos)	Recuperación primaria de hongos en sangre, principalmente levaduras
	Agar cromogénico	Identificación presuntiva de levaduras principalmente del género <i>Candida</i>
	Agar arroz/Agar Papa Dextrosa (PDA)	Inducción de esporulación y producción de pigmentos para identificación fenotípica de hongos
Medios especializados	Agar Dixon	Medio que contiene ácidos grasos que favorecen el crecimiento y aislamiento de hongos lipofílicos como <i>Malassezia</i> spp.
	Agar con L-Dopa o Agar semilla de girasol	Aislamiento de <i>Cryptococcus neoformans</i> , evidenciado por la producción de un pigmento marrón en el agar, producto del metabolismo de ácido cafeico
	Agar urea	Identificación de hongos que producen ureasa como <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Trichosporon</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp. y <i>Trichophyton interdigitale</i> . La ureasa genera un cambio en el pH, que es evidenciado por el cambio de color del medio a rosado-fucsia

Pruebas inmunológicas

Detección de anticuerpos	Imunodifusión	Detección de anticuerpos principalmente contra <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> y <i>Sporothrix schenckii</i>
	Fijación del complemento	Detección de anticuerpos contra <i>Histoplasma capsulatum</i> y <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Detección de antígenos	Inmunoensayo enzimático (ELISA)	Detección de anticuerpos contra <i>Candida</i> spp. y <i>Aspergillus</i> spp.
	Aglutinación con partículas de látex	Detección del antígeno capsular de <i>Cryptococcus neoformans</i>
	ELISA para 1,3-β-D-glucano	Detección del polisacárido de diferentes hongos (panfúngica)
	ELISA para Mananos	Detección del polisacárido de la pared de especies de <i>Candida</i>
	ELISA para Galactomananos	Detección del polisacárido principalmente de la pared de <i>Aspergillus</i> spp.
	<i>Lateral Flow</i> para antígenos secretados o capsulares	Detección de antígenos de <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Cryptococcus neoformans</i> por inmunocromatografía (<i>Lateral Flow</i>)
	Cromatografía de gases acoplada a masas para la detección de compuestos volátiles	Detección de compuestos volátiles. De utilidad en el diagnóstico de infecciones pulmonares por <i>Aspergillus</i> spp.

Pruebas moleculares

Amplificación de ácidos nucleicos	Técnicas basas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Identificación de diferentes hongos tanto de muestras biológicas como de cultivos por la amplificación de diferentes dianas de ADN fúngico
Secuenciación	Secuenciación de Sanger o piro-secuenciación	Permiten la identificación de hongos a partir de muestras clínicas o de cultivos por secuenciación de dianas específicas
Identificación de perfiles proteicos	MALDI-TOF	Identificación de diferentes hongos por la huella peptídica a partir de muestras clínicas y de cultivos

Tomado y modificado de *Laboratory diagnostics of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach* por L. Bašková & V. Buchta, 2012, *Folia Microbiologica*, 57, p. 423. Copyright © 2012 por Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic [72]

Conclusiones

A pesar de la amenaza que representan las infecciones fúngicas para la salud humana, en particular las invasivas y las diseminadas, debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad que causan, aún no se tiene la suficiente conciencia sobre la magnitud del problema, por lo que continúan siendo un desafío en lo que al control, el diagnóstico y el tratamiento se refiere.

Hasta ahora se han logrado importantes avances en el desarrollado de técnicas de laboratorio que apoyan el diagnóstico micológico. Aunque algunas han contribuido a mejorar el diagnóstico, existen limitaciones para su implementación en los laboratorios dedicado al diagnóstico microbiológico de rutina por la falta de estandarización, la baja sensibilidad o especificidad, y por el costo de algunas de ellas. Por lo tanto, la búsqueda de una prueba sencilla, que supere en tiempo, sensibilidad y especificidad al examen directo y al cultivo, considerado actualmente el estándar de referencia, continúa siendo una tarea pendiente.

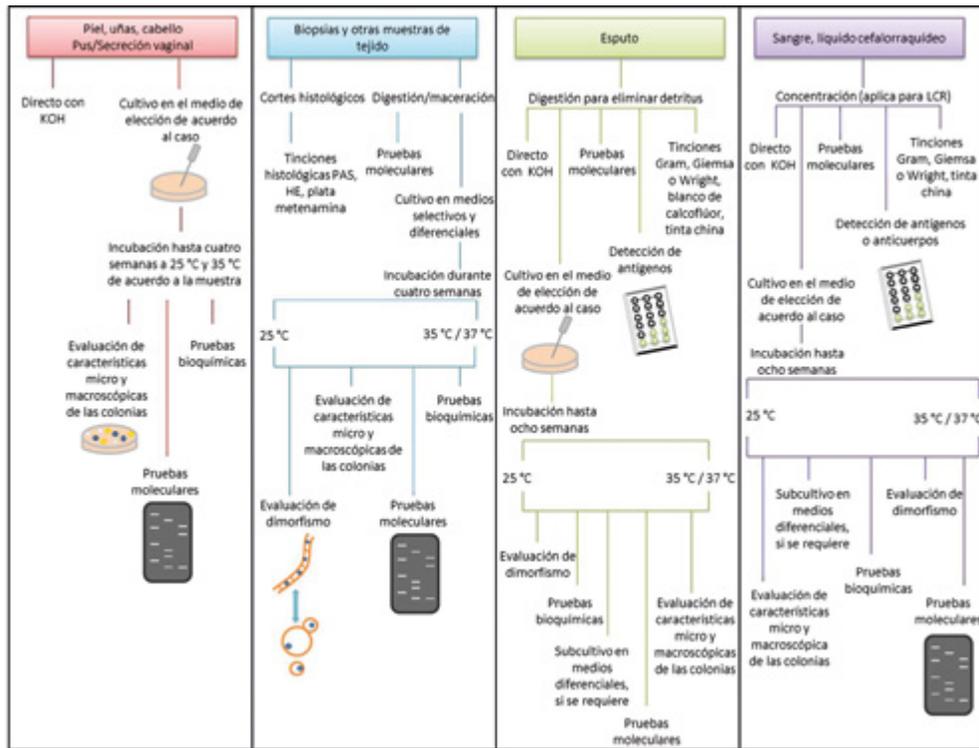


Figura 7. Algoritmo general a seguir en el procesamiento de las principales muestras biológicas en el laboratorio para el diagnóstico micológico. Tomado y modificado de *The Fungi of Medical Importance* (p. 671) en: *Foundations in Microbiology* por K.P. Taloro & B. Chess, 2015, Nueva York, Estados Unidos: McGraw-Hill Education. Copyright® 2015 por McGraw-Hill Education [11].

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Antioquia por el apoyo económico a la coautora Sindy V. Flórez-Muñoz en el marco del Programa Jóvenes Investigadores 2015.

Bibliografía

- Binder U, Lzass-Flori C. Epidemiology of invasive fungal infections in the mediterranean area. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; 3: e20110016.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36: 1-53.
- Pierce CG, Lopez-Ribot JL. Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opin Drug Discov* 2013; 8: 1117-1126.
- Peman J, Salavert M. [General epidemiology of invasive fungal disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 90-98.
- Perfect JR. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr Med Res Opin* 2013; 29 Suppl 4: 3-11.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-163.
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, Worm B. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol* 2011; 9: e1001127.
- Schmit JP, Mueller GM. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers Conserv* 2006; 16: 99-111.
- García-Solache MA, Casadevall A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *MBio* 2010; 1.
- Jain N, Fries BC. *Fungal Infections in Humans*. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd; 2011.

11. Talaro KP, Chess B. The Fungi of Medical Importance. Foundations in Microbiology (ed 9a). Nueva York, Estados Unidos: McGraw-Hill Education; 2015.
12. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012; 4: 165rv113.
13. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 Suppl 4: 5-24.
14. Hsu LY, Wijaya L, Shu-Ting Ng E, Gotuzzo E. Tropical fungal infections. *Infect Dis Clin North Am* 2012; 26: 497-512.
15. Ribeiro CS, Zaitz C, Framil VM, Ottoboni TS, Tonoli MS, Ribeiro RP. Descriptive study of onychomycosis in a hospital in Sao Paulo. *Braz J Microbiol* 2015; 46: 485-492.
16. Cruz Ch R, Ponce EE, Calderón R L, Delgado VN, Vieille O P, Piontelli L E. Micosis superficiales en la ciudad de Valparaíso, Chile: Período 2007-2009. *Rev Chil Infect* 2011; 28: 40-409.
17. Martínez Mendez D, Hernández Valles R, Alvarado P, Mendoza M. [Mycoses in Venezuela: Working Groups in Mycology reported cases (1984-2010)]. *Rev Iberoam Micol* 2013; 30: 39-46.
18. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latge JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5: a019786.
19. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 695-704.
20. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 561-570.
21. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 189-195.
22. Sanclemente G, Mahecha M, Guzman C. Enfermedades de la piel más frecuentes en la consulta externa dermatológica del Hospital Universitario San Vicente de Paúl y del Hospital Infantil. Medellín, 1999 *Acta Méd Colomb* 2001; 26: 240-244.
23. Mejía-Arango MA, Santa-Vélez C, Cadavid-Sierra M, Vélez LM, Colmenares LM, Restrepo-Jaramillo BN, et al. Estudio etiológico y epidemiológico de las micosis cutáneas en un laboratorio de referencia - Antioquia - Colombia. *CES Med* 2013; 27: 7-19.
24. Zuluaga de C A, de Bedout C, Tabares A, Cano LE, Restrepo A, Arango M, et al. Comportamiento de los agentes etiológicos de las onicomicosis en un laboratorio de micología de referencia (Medellín 1994-2003). *Med Cutan Iber Lat Am* 2005; 33: 251-256.
25. Rubio G, Sanchez G, Porras L, Alvarado Z. [Sporotrichosis: prevalence, clinical and epidemiological features in a reference center in Colombia]. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 75-79.
26. Mesa Arango A, Sánchez M. Esporotrichosis: una experiencia en Medellín, Antioquia. *Rev Mex Micol* 2000; 16: 11-16.
27. Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. *Epidemiol Infect* 2001; 126: 309-315.
28. Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobon AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29: 182-197.
29. Torrado E, Castañeda E, de la Hoz F, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: definición de las áreas endémicas de Colombia. *Biomédica* 2000; 20: 327-334.
30. The Society for Leukocyte Biology. Membership directory. The Society for Leukocyte Biology. *J Leukoc Biol* 1989; 46: 367-405.
31. Escadón P, de Bedout C, Lizarazo J, Agudelo CI, Tobón Á, Bello S, et al. Cryptococcosis in Colombia: Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. *Biomédica* 2012; 32: 386-398.
32. Cortes JA, Jaimes JA, Leal AL. [Incidence and prevalence of candidemia in critically ill patients in Colombia]. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30: 599-604.
33. Ortiz Ruiz G, Osorio J, Valderrama S, Alvarez D, Elias Diaz R, Calderon J, et al. Risk factors for candidemia in non-neutropenic critical patients in Colombia. *Med Intensiva* 2015.
34. Tille PM. Overview of Fungal Identification Methods and Strategies. En: Tille PM, ed. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (ed 13a). Misuri, Estados Unidos: Elsevier Mosby; 2014: 705-731.
35. Mendoza N, Palacios CP, Cardona N, Gómez Vargas LM. Onicomicosis: afección común de difícil tratamiento. *Rev Asoc Colomb Dermatol* 2012; 20: 149-158.
36. Feuilhade de Chauvin M. [Treatment of onychomycosis]. *J Mycol Med* 2014; 24: 296-302.
37. Mahajan VK. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. *Dermatol Res Pract* 2014; 2014: 272376.
38. Krzysciak PM, Pindycka-Piaszczyńska M, Piaszczyński M. Chromoblastomycosis. *Postepy Dermatol Alergol* 2014; 31: 310-321.
39. Welsh O, Al-Abdely HM, Salinas-Carmona MC, Fahal AH. Mycetoma medical therapy. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e3218.
40. Francesconi VA, Klein AP, Santos AP, Ramasawmy R, Francesconi F. Lobomycosis: epidemiology, clinical presentation, and management options. *Ther Clin Risk Manag* 2014; 10: 851-860.
41. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* 2009; 37: 1612-1618.
42. Patel PK, Erlandsen JE, Kirkpatrick WR, Berg DK, Westbrook SD, Loudon C, et al. The Changing Epidemiology of Oropharyngeal Candidiasis in Patients with HIV/AIDS in the Era of Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Treat* 2012; 2012: 262471.
43. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369: 1961-1971.
44. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the pro-

- spective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1695-1703.
45. Del Palacio A, Villar J, Alhambra A. [Epidemiology of invasive candidiasis in pediatric and adult populations]. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26: 2-7.
 46. Spellberg B, Marr K, SG F. En: Calderone RA CC, ed. *Candida and Candidiasis*. Washington, DC: ASM Press; 2012: 225-242.
 47. Almira B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela 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: 1829-1835.
 48. Chai LY, Denning DW, Warn P. *Candida tropicalis* in human disease. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36: 282-298.
 49. Ngamskulrungraj P, Chang Y, Roh J, Kwon-Chung KJ. Differences in nitrogen metabolism between *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*, the two etiologic agents of cryptococcosis. *PLoS One* 2012; 7: e34258.
 50. Byrnes EJ, 3rd, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect* 2011; 13: 895-907.
 51. Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 682-700.
 52. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T, et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection* 2013; 41: 645-653.
 53. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Pelaez T, Peman J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 3380-3387.
 54. Morace G, Borghi E. Invasive mold infections: virulence and pathogenesis of mucorales. *Int J Microbiol* 2012; 2012: 349278.
 55. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.
 56. Lass-Flörl C, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, et al. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br J Haematol* 2005; 131: 201-207.
 57. Kontoyiannis DP, Lewis RE, May GS, Osherov N, Rinaldi MG. *Aspergillus nidulans* is frequently resistant to amphotericin B. *Mycoses* 2002; 45: 406-407.
 58. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 2009; 52: 206-222.
 59. 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: 625-632.
 60. Nucci M, Varon AG, Garnica M, Akiti T, Barreiros G, Trope BM, et al. Increased incidence of invasive fusariosis with cutaneous portal of entry, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1567-1572.
 61. Muhammed M, Coleman JJ, Carneiro HA, Mylonakis E. The challenge of managing fusariosis. *Virulence* 2011; 2: 91-96.
 62. Esnakula AK, Summers I, Naab TJ. Fatal disseminated fusarium infection in a human immunodeficiency virus positive patient. *Case Rep Infect Dis* 2013; 2013: 379320.
 63. Kontoyiannis DP, Lewis RE. How I treat mucormycosis. *Blood* 2011; 118: 1216-1224.
 64. Hage CA, Knox KS, Wheat LJ. Endemic mycoses: overlooked causes of community acquired pneumonia. *Respir Med* 2012; 106: 769-776.
 65. Marques SA. Paracoccidioidomycosis. *Clin Dermatol* 2012; 30: 610-615.
 66. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol* 2015; 53: 3-14.
 67. Jarbouli MA, Mseidi F, Sellami H, Sellami A, Makni F, Ayadi A. [Pneumocystis: epidemiology and molecular approaches]. *Pathol Biol (Paris)* 2013; 61: 239-244.
 68. Kauffman CA. Pearls in Establishing a Clinical Diagnosis: Signs and Symptoms. En: Maertens JA, Marr KA, eds. *Diagnosis of Fungal Infections*. Nueva York, Estados Unidos: Informa Healthcare USA, Inc.; 2007: 1-17.
 69. Abu-Elteen KH, Hamad MA. Changing Epidemiology of Classical and Emerging Human Fungal Infections: A Review. *Jordan J Biol Sci* 2012; 5: 215-230.
 70. Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Satoh K, Najafzadeh MJ, et al. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Med Mycol* 2014; 52: 674-688.
 71. Monod M, Lurati M, Baudraz-Rosset F. [Diagnosis of non dermatophyte onychomycosis and its relevance for treatment]. *Rev Med Suisse* 2013; 9: 730-733.
 72. Baskova L, Buchta V. Laboratory diagnostics of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach. *Folia Microbiol (Praha)* 2012; 57: 421-430.
 73. Bernal-Martinez L, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M. Diagnostics and susceptibility testing in *Aspergillus*. *Future Microbiol* 2016; 11: 315-328.
 74. Ayats J, Martin-Mazuelos E, Peman J, Quindos G, Sanchez F, Garcia-Rodriguez J, et al. [Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29: 39 e31-15.
 75. Chaya AK, Pande S. Methods of specimen collection for diagnosis of superficial and subcutaneous fungal infections. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2007; 73: 202-205.
 76. Mulla AF, Shah AA, Koshy AV, Mayank M. Laboratory diagnosis of fungal infection. *Univ Res J Dent* 2015; 5: 49-53.
 77. Verweij PE, van der Lee HAL, Rijs AJMM. The Role of Conventional Diagnostic Tools. En: Maertens JA, Marr KA, eds. *Diagnosis of Fungal Infections*. Nueva York, Estados Unidos: Informa Healthcare USA, Inc.; 2007: 19-39.
 78. Guamer J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 247-280.
 79. Quindos G, Eraso E, Lopez-Soria LM, Ezepeleta G. [Invasive fungal disease: conventional or molecular mycological diagnosis?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 560-571.

80. Koziel TR, Wickes B. Fungal diagnostics. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4: a019299.
81. Lamoth F, Alexander BD. Nonmolecular methods for the diagnosis of respiratory fungal infections. *Clin Lab Med* 2014; 34: 315-336.
82. Guimaraes AJ, Pizzini CV, De Matos Guedes HL, Albuquerque PC, Peralta JM, Hamilton AJ, et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. *J Med Microbiol* 2004; 53: 509-514.
83. de Azevedo PZ, Sylvestre TF, Cavalcante Rde S, de Carvalho LR, Moris DV, de Oliveira ML, et al. Evaluation of the Double Agar Gel Immunodiffusion Test and of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis and Follow-Up of Patients with Chronic Pulmonary Aspergillosis. *PLoS One* 2015; 10: e0134841.
84. Alvarado P, Ostos A, Franquiz N, Roschman-Gonzalez A, Zambrano EA, Mendoza M. [Serological diagnosis of sporotrichosis using an antigen of *Sporothrix schenckii* sensu stricto mycelium]. *Invest Clin* 2015; 56: 111-122.
85. Held J, Kohlberger I, Rappold E, Busse Grawitz A, Hacker G. Comparison of (1->3)-beta-D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec Candida antigen as serum biomarkers for candidemia. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1158-1164.
86. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* 2010; 14: R222.
87. Fernandes VC, Coitinho JB, Veloso JM, Araujo SA, Pedroso EP, Goes AM. Combined use of Paracoccidioides brasiliensis recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Methods* 2011; 367: 78-84.
88. Zhang X, Gibson B, Jr., Daly TM. Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of histoplasmosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 4095-4101.
89. Hage CA, Ribes JA, Wengenack NL, Baddour LM, Assi M, McKinsey DS, et al. A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 448-454.
90. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1813-1821.
91. Einsele H, Loeffler J. Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 Suppl 4: 37-45.
92. Lu Y, Chen YQ, Guo YL, Qin SM, Wu C, Wang K. Diagnosis of invasive fungal disease using serum (1->3)-beta-D-glucan: a bivariate meta-analysis. *Intern Med* 2011; 50: 2783-2791.
93. Arvanitis M, Mylonakis E. Diagnosis of invasive aspergillosis: recent developments and ongoing challenges. *Eur J Clin Invest* 2015; 45: 646-652.
94. Kauffman CA, Bergman AG, Severance PJ, McClatchey KD. Detection of cryptococcal antigen. Comparison of two latex agglutination tests. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 106-109.
95. Wang H, Yuan X, Zhang L. Latex agglutination: diagnose the early cryptococcus neoformans test of capsular polysaccharide antigen. *Pak J Pharm Sci* 2015; 28: 307-311.
96. Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1095-1105.
97. Pan Z, Fu M, Zhang J, Zhou H, Fu Y, Zhou J. Diagnostic accuracy of a novel lateral-flow device in invasive aspergillosis: a meta-analysis. *J Med Microbiol* 2015; 64: 702-707.
98. White PL, Parr C, Thornton C, Barnes RA. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1510-1516.
99. de Heer K, van der Schee MP, Zwiderman K, van den Berk IA, Visser CE, van Oers R, et al. Electronic nose technology for detection of invasive pulmonary aspergillosis in prolonged chemotherapy-induced neutropenia: a proof-of-principle study. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1490-1495.
100. Koo S, Thomas HR, Daniels SD, Lynch RC, Fortier SM, Shea MM, et al. A breath fungal secondary metabolite signature to diagnose invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 1733-1740.
101. Heddergott C, Calvo AM, Latge JP. The volatome of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2014; 13: 1014-1025.
102. Hoog G, Guarro J, Tan C, Wintermans R, Gené J. Hyphomycetes. En: Hoog G, Guarro J, Gené J, Figueras M, eds. *Atlas of clinical fungi* (ed 2da). Utrecht, Países Bajos: ASM Press; 2000: 380-1007.
103. Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E. Fusarium pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol* 2011; 115: 1279-1289.
104. Kurzai O. *Human Fungal Pathogens* (ed 2da). Berlín, Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014.
105. Bhabhra R, Askew DS. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Med Mycol* 2005; 43 Suppl 1: S87-93.
106. Anaisie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology* (ed 2da). Edimburgo, Escocia: Churchill Livingstone; 2009.
107. Szanislo PJ. *Fungal Dimorphism with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans*. Nueva York, Estados Unidos: Springer US; 1985.
108. Neppelenbroek KH, Seo RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis* 2014; 20: 329-344.
109. Balajee SA, Lindsley MD, Iqbal N, Ito J, Pappas PG, Brandt ME. Nonsporulating clinical isolate identified as *Petromyces alliaceus* (anamorph *Aspergillus alliaceus*) by morphological and sequence-based methods. *J Clin Mi-*

- crobiol 2007; 45: 2701-2703.
110. Paniz-Mondolfi A, Talhari C, Sander Hoffmann L, Connor DL, Talhari S, Bermudez-Villapol L, et al. Lobomycosis: an emerging disease in humans and delphinidae. *Mycoses* 2012; 55: 298-309.
 111. Hazen KC. Respiratory fungal infections: molecular diagnostic tests. *Clin Lab Med* 2014; 34: 351-364.
 112. Rola B, Pawlik A, Frac M, Malek W, Targonski Z, Rogalski J, et al. The phenotypic and genomic diversity of *Aspergillus* strains producing glucose dehydrogenase. *Acta Biochim Pol* 2015; 62: 747-755.
 113. Gabal MA. Development of a chromosomal DNA probe for the laboratory diagnosis of aspergillosis. *Mycopathologia* 1989; 106: 121-129.
 114. Moncada PA, Budytyeni I, Ho DY, Deresinski SC, Montoya JG, Banaei N. Utility of DNA sequencing for direct identification of invasive fungi from fresh and formalin-fixed specimens. *Am J Clin Pathol* 2013; 140: 203-208.
 115. Ranque S, Normand AC, Cassagne C, Murat JB, Bourgeois N, Dalle F, et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses* 2014; 57: 135-140.
 116. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Molecular Diagnosis of Pathogenic Sporothrix Species. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0004190.
 117. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky Jj, White TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. California, Estados Unidos: Academic Press Inc; 1990: 315-322.
 118. Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 1201-1221.
 119. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, et al. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3922-3925.
 120. Sun W, Wang K, Gao W, Su X, Qian Q, Lu X, et al. Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *PLoS One* 2011; 6: e28467.
 121. Johnson GL, Bibby DF, Wong S, Agrawal SG, Bustin SA. A MIQE-compliant real-time PCR assay for *Aspergillus* detection. *PLoS One* 2012; 7: e40022.
 122. 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: 890-896.
 123. Das S, Larone DH. Basics of molecular methods for fungal identification En: Larone DH, ed. *Medically important fungi: a guide to identification* (ed 5a). Washington D.C., Estados Unidos: ASM Press; 2011: 317-335.
 124. Fortun J, Meije Y, Buitrago MJ, Gago S, Bernal-Martinez L, Peman J, et al. Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 3134-3141.
 125. Lau A, Halliday C, Chen SC, Playford EG, Stanley K, Sorrell TC. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 811-816.
 126. Landlinger C, Preuner S, Willinger B, Haberpursch B, Racil Z, Mayer J, et al. Species-specific identification of a wide range of clinically relevant fungal pathogens by use of Luminex xMAP technology. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1063-1073.
 127. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27: 490-526.
 128. Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol* 2007; 45: 475-490.
 129. Romanelli AM, Sutton DA, Thompson EH, Rinaldi MG, Wickes BL. Sequence-based identification of filamentous basidiomycetous fungi from clinical specimens: a cautionary note. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 741-752.
 130. CADTH Rapid Response Reports. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Pathogen Identification: A Review of Accuracy and Clinical Effectiveness. Ottawa, Canada: Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2015.
 131. Webster J, Oxley D. Protein Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. En: Zanders DE, ed. *Chemical Genomics and Proteomics: Reviews and Protocols*. Nueva Jersey, Estados Unidos: Humana Press; 2012: 227-240.
 132. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2110-2115.
 133. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 547-603.
 134. Chalupova J, Raus M, Sedlarova M, Sebel M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol Adv* 2014; 32: 230-241.
 135. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Vega M, Gonzalez M, Garcia MI, Rodriguez S, et al. Identification of fungal clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Rev Esp Quimioter* 2013; 26: 193-197.
 136. Becker PT, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol* 2014; 52: 826-834.
 137. Sow D, Fall B, Ndiaye M, Ba BS, Sylla K, Tine R, et al. Usefulness of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Routine Identification of *Candida* Species in a Resource-Poor Setting. *Mycopathologia* 2015; 180: 173-179.