

## Diagnóstico micológico por técnicas no convencionales en el siglo XXI

### Mycological diagnosis by non-conventional techniques in the 21<sup>st</sup> century

Elizabeth Fuentes Feria<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3409-1436>

María Teresa Illnait-Zaragozí<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8929-6172>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [eliff@nauta.cu](mailto:eliff@nauta.cu); [eliff@ipk.sld.cu](mailto:eliff@ipk.sld.cu)

#### RESUMEN

**Introducción:** En la actualidad las infecciones fúngicas representan un problema para la salud humana. Las infecciones causadas por especies patógenas de hongos registran un incremento constante y se ubican entre el cuarto y décimo lugar como causa de muerte, particularmente en las unidades de cuidado intensivo. Un diagnóstico adecuado y precoz impacta directamente en la morbilidad y mortalidad asociadas a estas.

**Objetivo:** Describir las principales técnicas de diagnóstico no convencional de las enfermedades fúngicas más frecuentes, en especial las relacionadas con el diagnóstico serológico y molecular.

**Métodos:** Se realizó una revisión de la literatura científica sobre el tema, publicada entre 2000 y 2019. Se revisaron un total de 63 trabajos. Como motores de búsqueda se emplearon Google y Google Scholar. Se revisaron las bases de datos Medline, PubMed, Science Direct, BUCea y SciELO.

**Análisis y síntesis de la información:** Las técnicas serológicas se emplean en el diagnóstico de las micosis invasivas o sistémicas por ser fáciles, rápidas y confiables. La detección de anticuerpos tiene utilidad limitada en el diagnóstico de las micosis invasivas debido a que la respuesta puede estar retrasada, reducida o no existir en pacientes inmunocomprometidos. La detección de componentes no antigénicos liberados por los hongos durante la infección y la secuenciación de ácidos nucleicos fúngicos son otras opciones para el diagnóstico de las micosis.

**Conclusiones:** El desarrollo biotecnológico aporta nuevas herramientas que incrementan las oportunidades de identificación de las micosis. En la actualidad se disponen de métodos basados tanto en la detección de marcadores inmunológicos como de elementos moleculares específicos. La eficacia de las herramientas no convencionales para el diagnóstico depende de la correcta combinación de estas.

**Palabras clave:** micosis; diagnóstico serológico; diagnóstico molecular; PCR; MALDI-TOF.

## ABSTRACT

**Introduction:** Fungal infections are a current human health problem. Infections caused by pathogenic fungal species constantly increase in number, and are ranked between the fourth and tenth leading causes of death, particularly in intensive care units. Early accurate diagnosis has a direct impact on the morbidity and mortality of fungal infections.

**Objective:** Describe the main non-conventional diagnostic techniques for the most common fungal diseases, especially those related to serological and molecular diagnosis.

**Methods:** A review was conducted of the scientific literature about the topic published between the years 2000 and 2019. A total 63 publications were reviewed. The search engines used were Google and Google Scholar. The databases Medline, PubMed, Science Direct, BUCea and SciELO were reviewed.

**Data analysis and synthesis:** Serological techniques are used for the diagnosis of invasive or systemic mycoses because they are easy, fast and reliable. The detection of antibodies has a limited usefulness in invasive mycosis diagnosis, for the response may be delayed, reduced or inexistent in immunocompromised patients. Detection of non-antigenic components released by fungi during infection and sequencing of fungal nucleic acids are other mycosis diagnosis options.

**Conclusions:** Biotechnological development contributes new tools increasing mycosis identification opportunities. Methods are currently available which are based on detection of immunological markers and specific molecular elements. The efficacy of non-conventional diagnostic tools depends on their appropriate combination.

**Keywords:** mycosis; serological diagnosis; molecular diagnosis; PCR; MALDI-ToF.

Recibido: 28/01/2020

Aceptado: 07/08/2020

## Introducción

A mediados del siglo XX se conocían alrededor de 20 especies patógenas de hongos y en la actualidad se identifican más de 400, la mayoría de las cuales actúan de forma oportunista.<sup>(1,2)</sup> De manera paralela, las infecciones causadas por estos agentes registran un incremento constante y se ubican entre el cuarto y décimo lugar como causa de muerte, particularmente en las unidades de cuidado intensivo.<sup>(2,3)</sup>

Se estima que más de mil millones de personas en el mundo sufren una infección fúngica grave y que más de 1,3 millones fallecen anualmente por esta causa, equiparable a la que ocasionan la tuberculosis y la malaria (1,4 y 1,2 millones de muertes anuales, respectivamente).<sup>(4,5)</sup> Solo la aspergilosis y la candidiasis invasivas ocasionan tasas de mortalidad entre el 60 % y el 90 %.<sup>(6,7)</sup>

Los métodos de diagnóstico microbiológico tradicionales presentan limitaciones que ocasionan retraso en la instauración del tratamiento específico oportuno y favorecen la aparición de daños orgánicos irreversibles. Lo anterior dio lugar al desarrollo de otros métodos que suplieran dichas deficiencias.<sup>(5,8)</sup>

El objetivo del presente trabajo fue describir las principales técnicas de diagnóstico no convencional de las enfermedades fúngicas más frecuentes, en especial las relacionadas con el diagnóstico serológico y molecular.

## Métodos

Se compiló la información disponible sobre las técnicas no convencionales de diagnóstico de las infecciones fúngicas mediante una revisión bibliográfica de la literatura científica publicada entre los años 2000 y 2019. Se utilizaron como criterios de búsqueda los descriptores: diagnóstico micológico, diagnóstico precoz, inmunodiagnóstico, manano, galactomanano, D-arabinitol,  $\beta$ -D-glucano, serología, inmunodifusión, aglutinación con látex, inmunocromatografía, diagnóstico molecular, marcadores moleculares, PCR, MALDI-TOF, infecciones fúngicas, candidiasis, criptococosis, histoplasmosis, aspergilosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis.

Como motores de búsqueda se emplearon Google y Google Scholar. Se revisaron las bases de datos Medline, PubMed, Science Direct, BUCea y SciELO. Se descartaron los trabajos duplicados, los de otros idiomas diferentes al español o inglés, los que no se ajustaban al tema, los que mostraban

insuficientes datos de origen, las propagandas no científicas, las relacionadas con cursos y congresos, así como las presentaciones y los comentarios.

## Análisis y síntesis de la información

### Diagnóstico serológico

Las técnicas serológicas se emplean en el diagnóstico de las micosis invasivas o sistémicas (Cuadro 1) por ser fáciles, rápidas y confiables. Estas permiten la detección de antígenos fúngicos o de la respuesta de anticuerpos que se produce durante el desarrollo de la micosis.<sup>(9)</sup>

**Cuadro 1** - Utilidad de la serología en el diagnóstico de las micosis<sup>(2,5,10,11)</sup>

Micosis	Detección de	
	Anticuerpos	Antígenos
Aspergilosis	Sí	Sí
Blastomicosis	Sí	Sí
Candidiasis	Sí	Sí
Criptococosis	No	Sí
Coccidioidomicosis	Sí	No
Histoplasmosis	Sí	Sí
Neumocistosis	No	Sí
Paracoccidioidomicosis	Sí	No

### Detección de anticuerpos

Tiene utilidad limitada en el diagnóstico de las micosis invasivas debido a que la respuesta puede estar retrasada, reducida o no existir en pacientes inmunocomprometidos. Estos problemas podrían resolverse al elegir epítopes antigénicos apropiados y al utilizar técnicas más sensibles para detectar títulos bajos. El estudio de muestras seriadas del paciente permite analizar la evolución de dichos títulos y su correlación con los datos clínicos y microbiológicos.<sup>(9,12)</sup>

A continuación se describen las pruebas más empleadas para el diagnóstico de las infecciones fúngicas más relevantes.

#### a) Detección de anticuerpos para el diagnóstico de candidiasis

El sistema de ensayo inmunoenzimático ligado a una fase sólida, o ELISA de sus siglas en inglés (*Enzyme linked immunosorbent assay*), se emplea de forma amplia para la detección de anticuerpos en los líquidos corporales. Basado en esta tecnología se desarrolló el Platelia *Candida* Ab/Ac/Ak<sup>®</sup> (Bio-Rad, Francia), el cual detecta anti-manano de *Candida*. Estos anticuerpos aparecen antes de las manifestaciones clínicas y se asocia a un riesgo mayor de candidiasis invasiva (CI) en pacientes neutropénicos. Presenta una sensibilidad y una especificidad del 50 % y 94 %, respectivamente. La utilización simultánea con el Platelia *Candida* Ag<sup>®</sup> (Bio-Rad, Francia) aumenta la sensibilidad del diagnóstico a un 80 %. Sin embargo, debido a la alta prevalencia de anticuerpos anti-manano en la población, se investigan otros marcadores más específicos de CI como los dirigidos contra antígenos citoplasmáticos y los expresados en la fase micelial de *C. albicans*.<sup>(10)</sup>

La detección de anticuerpos antimicelio o anti-tubo germinativo se comercializa en forma de inmunofluorescencia indirecta (IFI), *Candida albicans* IFA IgG<sup>®</sup> (Laboratorios Vircell, España). La técnica presenta buenos resultados de sensibilidad (84-87 %) y especificidad (94,7-95 %) para el diagnóstico de la infección sistémica por *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* y *Candida dubliniensis*, cuando se utiliza valor de corte > 1:160. Esta prueba permite distinguir entre candidemia transitoria o relacionada con catéter y la candidemia asociada a infección profunda y el seguimiento evolutivo de la infección al detectar cantidades decrecientes de anticuerpos en los pacientes que responden al tratamiento antifúngico.<sup>(13,14,15)</sup>

#### b) Detección de anticuerpos en la aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergilosis pulmonar crónica y aspergiloma

El 90 % de los pacientes inmunocompetentes poseen anticuerpos detectables anti-*Aspergillus*.<sup>(16,17)</sup> *Aspergillus fumigatus* es quien, con mayor frecuencia, se encuentra implicado en el desarrollo de estas afecciones. Los individuos con fibrosis quística constituyen una población con riesgo importante para esta infección.<sup>(18,19)</sup>

El estuche comercial *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA (IBL-America) permite determinar la presencia de anticuerpos IgG anti-*Aspergillus* en muestras de sueros de pacientes con sospecha clínica de aspergilosis pulmonar crónica.<sup>(17)</sup>

El diagnóstico de aspergilosis broncopulmonar alérgica descansa en cinco criterios, entre ellos la detección sérica de anticuerpos específicos. Platelia™ *Aspergillus* IgG (Bio-Rad, Francia) se basa en una técnica inmunoenzimática indirecta que permite detectar, en suero o plasma, IgG dirigidas contra un antígeno recombinante purificado de *Aspergillus*.<sup>(20,21)</sup>

*Aspergillus fumigatus* IgG ELISA IgG (Bordier Affinity Products SA, Suiza) permite la detección cuantitativa de IgG contra *A. fumigatus* en suero; también se utiliza para el seguimiento de pacientes en riesgo de desarrollar aspergilosis. Dumollard y otros refieren que esta técnica alcanza una sensibilidad del 97 % en pacientes afectados por diversos tipos de aspergilosis. De igual forma, se obtuvo una especificidad del 90,3 % en pacientes con síntomas respiratorios en los que se descartaron enfermedades relacionadas con *Aspergillus*.<sup>(20)</sup>

### c) Detección de anticuerpos para el diagnóstico de las micosis endémicas

**Histoplasmosis:** existen pocas herramientas comerciales (Immy Diagnostics, Meridian, Diamedix; EE.UU.) las cuales se basan en la detección de anticuerpos mediante fijación del complemento (FC) o inmunodifusión.<sup>(22)</sup> Estos aparecen entre la segunda y la sexta semana de infección por lo que no son útiles para el diagnóstico en etapas tempranas pero permiten prever las complicaciones crónicas, como las meningitis. En individuos seropositivos al VIH solo son detectables en el 50 % de los casos y la presencia de un título aislado solo indica que el paciente tuvo contacto con *Histoplasma capsulatum*.<sup>(10)</sup>

Los ELISA son poco utilizados debido a la dificultad para normalizar la técnica y a su difícil interpretación. Presentan reacciones cruzadas con paracoccidiodomicosis, blastomicosis, aspergilosis, candidiasis y coccidiodomicosis.<sup>(23)</sup>

La inmunodifusión doble (IDD) se considera una prueba sencilla, económica y específica, aunque su sensibilidad es baja. Permite identificar dos bandas de precipitación entre la 4<sup>ta</sup> y 6<sup>ta</sup> semanas después de la exposición a *H. capsulatum*. Estas bandas corresponden al reconocimiento de los antígenos glicoproteicos H y M presentes en el suero de pacientes infectados.<sup>(23,24)</sup> El antígeno H tiene homología con una  $\beta$ -glucosidasa y se detecta hasta en el 10 % de los casos. Los anticuerpos anti-H indican infección activa y se observan con mayor frecuencia durante la infección diseminada, histoplasmosis pulmonar cavitaria crónica o histoplasmosis pulmonar aguda muy grave y tienden a desaparecer mucho más rápido.<sup>(23,25)</sup> El antígeno M tiene homología con una catalasa, se identifica en el suero de aproximadamente el 80 % de los pacientes y puede persistir durante años; su presencia indica infección tanto activa como pasada, o la aplicación reciente de una prueba intradérmica de histoplasmina.<sup>(23,24)</sup>

La FC es más sensible y menos específica que la IDD, pero requiere de experiencia y habilidad por parte del laboratorista. Los títulos de 1:8 y 1:16 se consideran débiles positivos y pudieran indicar

una infección anterior, en especial en individuos de áreas endémicas. Se recomienda realizar simultáneamente a la IDD para alcanzar un mayor éxito en el diagnóstico.<sup>(24)</sup>

**Coccidioidomycosis:** hace unos años, la prueba cutánea con esferulina o la coccidioidina, era el método de inmunodiagnóstico más empleado; sin embargo, esta resulta positiva en el 70 % de la población de áreas endémicas. Los ensayos comerciales de serodiagnóstico se basan en la detección de IgM o IgG ya sea en formato de ELISA, FC o IDD. La sensibilidad global es del 80 % pero pueden ser negativos en los estadios tempranos de infección. La probabilidad de falsos positivos es muy elevada cuando solo se evalúa IgM (82 %) y tienen sensibilidad reducida en pacientes inmunodeprimidos (50 %).<sup>(5,26)</sup>

**Paracoccidioidomycosis:** para su diagnóstico existen métodos basados en la IDD, la contraelectroforesis, la FC, la IFI y el ELISA. Se describe heterogeneidad alta en la validez diagnóstica. La sensibilidad y especificidad oscilan entre el 65-100 % y 90 % para la IDD cuando se utilizan filtrados de cultivos; entre 77-97 % y 95 % en la contraelectroforesis y entre 95-100 % y 88-93,4 % para el ELISA con filtrados de antígenos y gp43, respectivamente.<sup>(27)</sup> La positividad depende de dos condiciones: la capacidad inmunológica del paciente de producir anticuerpos y un período  $\geq 21$  días desde el inicio de los síntomas. Los títulos son más elevados en los individuos que desarrollan la forma grave de la enfermedad y se pueden detectar hasta dos años después de tratar la infección.<sup>(10)</sup>

## Detección de antígenos

A diferencia de la detección de anticuerpos, no necesita el tiempo de inducción de la respuesta inmune y no está influenciada por el estado inmunológico del paciente. Este tipo de diagnóstico está disponible para la mayoría de las micosis invasivas y demuestra utilidad en la histoplasmosis, la criptococosis, la aspergilosis y la candidiasis invasiva.<sup>(28)</sup>

### a) Detección de antígenos en el paciente crítico con candidiasis invasiva

El manano es un polisacárido localizado en la pared celular de la mayoría de las especies del género *Candida* de importancia médica y las evidencias apuntan a la utilidad de su detección en líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de la meningitis por *Candida*.<sup>(29)</sup> Sin embargo, cada especie presenta un contenido de manano variable y en pacientes con CI la mananemia es de corta duración, por lo que a pesar de ser específico resulta poco sensible y se recomienda el estudio de muestras seriadas para mejorar este parámetro.<sup>(14)</sup> Su detección mediante ELISA está disponible comercialmente (Platelia *Candida* Ag<sup>®</sup>; Bio-Rad, Francia). Esta prueba detecta residuos de manosa unidos por enlaces  $\alpha$  ( $\alpha$ -Man), la combinación con un ELISA que revele residuos de  $\beta$ -Man permite

alcanzar mejores resultados (sensibilidad del 90 %, especificidad del 95 %, VPP del 79 % y VPN del 97 %).<sup>(10)</sup>

La determinación de manano y anticuerpos anti-manano de forma combinada está recomendada en las guías clínicas europeas para el diagnóstico y manejo de la candidiasis.<sup>(14)</sup> Entre las limitaciones más importantes se encuentran la falta de reproducibilidad, la presencia de falsos positivos y negativos principalmente en los anticuerpos anti-manano y el gran número de resultados indeterminados en ambas técnicas.<sup>(10)</sup>

#### **b) Detección de galactomanano**

El galactomanano (GM) es un componente de la pared celular de *Aspergillus*, que se puede detectar mediante ELISA (Platelia *Aspergillus*; Bio-Rad, Francia) en suero, lavado broncoalveolar (LBA), biopsias, orina, LCR, líquido pericárdico y pleural de enfermos con aspergilosis invasiva (AI).<sup>(5,11)</sup> Se considera la prueba de oro para su diagnóstico y constituye un criterio micológico de infección probable según el consenso de la EORTC/MSG (*European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group del National Institute of Allergy and Infectious Diseases*).<sup>(11)</sup>

La mayor utilidad diagnóstica se describe en los pacientes oncohematológicos con riesgo de sufrir AI. En aquellos con neutropenia prolongada la sensibilidad es del 85 % y la especificidad superior al 95 %, con VPP y VPN mayores de 85 % y 95 %, respectivamente.<sup>(12)</sup> En este grupo de pacientes puede detectarse antes de que las manifestaciones clínicas y radiológicas aparezcan, lo que facilita el comienzo temprano del tratamiento antifúngico. La concentración de GM en el suero es un reflejo de la carga fúngica en los tejidos; su disminución, mantenimiento o incremento, podrían orientar sobre la evolución de la infección y la respuesta al tratamiento impuesto.<sup>(12)</sup>

La detección de GM en el LBA de pacientes con neutropenia presenta también un valor diagnóstico alto (sensibilidad de 91,3 %, VPP de 76 % y VPN de 96 %).<sup>(6)</sup> Sin embargo, en otros grupos como los receptores de trasplante de órganos sólidos, la sensibilidad es menor. Esto se debe a la diferente capacidad angio-invasiva de *Aspergillus* respecto a los pacientes hematológicos.<sup>(6)</sup> No se refieren diferencias entre los pacientes pediátricos y adultos.<sup>(6,12)</sup>

Se describen varias fuentes de falsos positivos. Entre estos, la reactividad cruzada con otros hongos (*Acremonium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Wangiella*), el uso de fármacos derivados de hongos (betalactámicos, sobre todo amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam) y otras formulaciones farmacológicas como la ciclofosfamida, inmunoglobulinas, hemoderivados y soluciones de alimentación parenteral. También se consideran fuentes de falsos positivos las dietas ricas en soja, la colonización digestiva por *Bifidobacterium* spp. y la enfermedad crónica de huésped contra

injerto. Los resultados falsos negativos son infrecuentes y se asocian fundamentalmente al empleo de antifúngicos activos frente a *Aspergillus*, a las aspergilosis localizadas y a las infecciones por *A. fumigatus* ya que posee menos GM que otras especies.<sup>(12,30)</sup>

#### c) Detección de la glicoproteína de 40 kDa de *Aspergillus*

En el año 2008 se describió una prueba inmunocromatográfica conocida como *Aspergillus lateral flow device*. Esta resulta específica para una glicoproteína de 40 kDa secretada durante el crecimiento activo de *Aspergillus*. Se utiliza en muestras de suero o LBA y su lectura se efectúa a los 15 min.<sup>(31)</sup> De forma global presenta sensibilidad y especificidad del 73,1 % y 50 %, respectivamente, siendo superiores en este último tipo de muestra.<sup>(31,32)</sup> Entre las principales ventajas figuran requerir capacitación mínima de personal de laboratorio, el manejo simple mediante el uso de muestras de LBA sin ningún tratamiento previo, la disponibilidad rápida de los resultados y los bajos costos.<sup>(11)</sup>

#### d) Detección de antígenos para el diagnóstico de criptococosis

Debido a su rapidez (10-15 min), sencillez y especificidad, la detección del antígeno capsular del complejo de especies *C. neoformans* / *C. gattii* en líquidos orgánicos, especialmente LCR, es de especial interés ante la sospecha de meningitis criptocócica. Permite diagnosticar aproximadamente el 99 % de este cuadro y el 67 % de las formas diseminadas. La sensibilidad oscila entre 93 y 100% en pacientes con sida debido a que en este tipo de enfermos se describen aislados con poca cápsula y concentraciones antigénicas bajas.<sup>(2,30,33)</sup>

La cuantificación del antígeno es útil para controlar la evolución de la enfermedad, ya que el título desciende si la respuesta terapéutica es buena y suele aumentar en el LCR días antes de que se produzca una recaída.<sup>(2,33)</sup> Las técnicas diseñadas para su detección están basadas en la aglutinación de partículas de látex o en el análisis inmunoenzimático. Estas se pueden aplicar a muestras de LCR, suero, secreciones respiratorias y orina.<sup>(10,11,30)</sup>

La aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con gamma-globulina de conejo anti-polisacárido capsular de *C. neoformans* tiene una sensibilidad cercana al 95 % y una especificidad entre 93 % y 100 %.<sup>(34)</sup> Se conocen falsos positivos debido a la presencia de factor reumatoideo, durante las infecciones por *Trichosporon* spp., *Capnocytophaga canimorsus* y en pacientes con septicemias o neoplasias. Las principales causas de falsos negativos se relacionan con la presencia de levaduras escasas, con poca o ninguna cápsula y al fenómeno prozona.<sup>(10,11,34)</sup>

*Cryptococcal Antigen Lateral Flow assay (CrAg® LFA)* es una técnica inmunocromatográfica diseñada para la detección cualitativa y semicuantitativa del glucuronoxilomanano en muestras de suero, plasma, orina y LCR.<sup>(11,35)</sup> Es una técnica sencilla, de fácil manejo, permite la obtención de

resultados en 10 min, no requiere de personal especializado, de laboratorios con infraestructura avanzada, refrigeración, ni pre-tratamiento de las muestras y es útil hasta dos años a temperatura ambiente.<sup>11</sup> La sensibilidad de la técnica en suero de pacientes seropositivos al VIH es del 93 % (IC 95 %: 66-100 %) y la especificidad del 100 % (IC 95 %: 88-100 %).<sup>(36)</sup>

#### e) Detección de antígenos para el diagnóstico de las micosis endémicas

**Histoplasmosis:** en esta micosis, la determinación antigénica se realiza principalmente en orina, aunque también se puede hacer en suero o LBA. El sistema más empleado es un ELISA, desarrollado por Immy diagnostics (Oklahoma *Alpha Histoplasma EIA Test Kit*) con una sensibilidad y especificidad del 81 % y 99 %, respectivamente.<sup>(37)</sup> En pacientes inmunodeprimidos con histoplasmosis pulmonar subaguda o crónica la sensibilidad del ensayo es superior al 95 %. Sin embargo, existe reacción cruzada con otros hongos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides brasiliensis* y *Aspergillus* spp.<sup>(5)</sup>

El ELISA del laboratorio MiraVista (Indianapolis, EE.UU.) presenta una sensibilidad del 92 % en orina y del 100 % en suero de pacientes con infección diseminada.<sup>(37)</sup> Sin embargo, en los casos con histoplasmosis pulmonar aguda o crónica la sensibilidad disminuye al 70 %. Este resultado se debe fundamentalmente a reacciones cruzadas con *Blastomyces*, lo que complica su uso en áreas endémicas de ambos patógenos.<sup>(38)</sup>

La detección de antígeno de *Histoplasma* en suero mediante un dispositivo de flujo lateral (MiraVista Diagnostics, Indianapolis, EE UU) en muestras provenientes de pacientes con sida e histoplasmosis diseminada confirmada por cultivo y de pacientes con otras infecciones tanto fúngicas como bacterianas mostró una sensibilidad de 95 % y una especificidad de 82 %.<sup>(39,40)</sup> Además de presentar reacción cruzada con paracoccidioidomicosis, blastomicosis y peniciliosis, la antigenuria y la antigenemia pueden presentar falsos positivos debido a la presencia de anticuerpos humanos inespecíficos. También se observan resultados falsos negativos como consecuencia de una carga fúngica baja al momento de la toma de la muestra o al uso de antifúngicos.<sup>(23)</sup>

**Paracoccidioidomicosis:** el antígeno que más se emplea es el gp43. Se evaluó en muestras sanguíneas, respiratorias y LCR de centenares de enfermos demostrando sensibilidad diagnóstica y utilidad para realizar el seguimiento de esta infección. La detección del antígeno gp70 también resulta útil para el diagnóstico de esta micosis.<sup>(10)</sup>

**Blastomicosis:** existen técnicas de detección antigénica en orina y en muestras respiratorias para el diagnóstico de esta micosis. Aunque el número de enfermos en el que se evaluó no resulta representativo, su sensibilidad es del 90 % en orina y del 75 % en LBA. Su principal limitación son las reacciones cruzadas con otras infecciones fúngicas endémicas y oportunistas, en particular la aspergilosis y la criptococosis.<sup>(10)</sup>

## Detección de componentes no antigénicos

La detección de componentes no antigénicos liberados por los hongos durante la infección es otra opción para el diagnóstico de las micosis. Entre ellos se destacan el D-arabinitol, metabolito producido durante la CI y el (1→3) β-D-glucano (BG), polisacárido presente en la pared celular de la mayoría de las especies fúngicas con la excepción de las especies del orden Mucorales y *Cryptococcus* spp. Estos liberan al medio de cultivo *in vitro* cantidades de BG < 200 pg/mL, por lo que dicha técnica no se recomienda para el diagnóstico de infecciones por estos agentes.<sup>(30,41)</sup> En contraste, *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. liberan una media de 2,119 pg/mL y 1,915 pg/mL, respectivamente.<sup>(10)</sup>

### a) Detección de D-arabinitol

El D-arabinitol es un metabolito producido por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr*. Puede detectarse mediante cromatografía de gas-líquido en suero y orina de pacientes con CI.<sup>(29)</sup>

Debido a que sus niveles son elevados en pacientes con fallo renal y este metabolito se excreta a través de los riñones al mismo ritmo que la creatinina, la proporción arabinitol/creatinina corrige sus variaciones en el suero debidas a la función renal. *Candida* solo produce D-arabinitol y el humano L-arabinitol por lo que la proporción D-arabinitol/L-arabinitol en la orina resulta un marcador temprano de la CI. Además, permite diferenciar a los pacientes con esta afección de los que tienen fallo renal. No obstante, la técnica resulta poco práctica debido a su complejidad.<sup>(29)</sup>

### b) Detección de (1, 3) β-D-glucano

La prueba diagnóstica se basa en la capacidad del BG de activar la cascada de coagulación en el lisado de amebocitos del cangrejo herradura *Limulus polyphemus*.<sup>(42)</sup> Puede detectarse en los líquidos biológicos (principalmente suero) y la interpretación de los resultados requiere personal con experiencia en la prueba. En la actualidad se comercializan: Fungitec-G® (*Seikagaku Kogyo Corporation*; Japón), Wako® WB003 (*Wako Pure Chemical Industries*; Japón), B-G Star® (*Maruha Corporation*; Japón) y Fungitell® (*Associates of Cape Cod Inc.*, EE. UU.). Todas detectan BG pero presentan diferencias en su límite de detección por lo que emplean puntos de corte diferentes.<sup>(10)</sup>

Se trata de una prueba diagnóstica panfúngica, por lo que un resultado positivo no permite identificar la especie causante de la infección. Es útil en el diagnóstico de AI en pacientes hematológicos (EORTC/MSG la aceptan para la clasificación de AI probable), de CI de origen abdominal y de neumonía por *Pneumocystis jiroveci*.<sup>(43)</sup>

Su detección presenta una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 100 %. Su VPP es del 59 %, el VPN del 97 % y la eficacia global del 85 %.<sup>(10)</sup> Permite predecir la infección de etiología fúngica en poblaciones de alto riesgo y fiebre.<sup>(44)</sup>

La sensibilidad analítica del ensayo está en el orden de 1 pg/mL. Los resultados falsos positivos se asocian a hemodiálisis, transfusión de sangre o derivados filtrados con membrana de celulosa, hemofiltración, bacteriemia por *Streptococcus* spp., *Alcaligenes* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*, la exposición a gases o esponjas quirúrgicas, en tratamiento con infusiones de albúmina e inmunoglobulinas, polisacáridos antitumorales (lentinano y polisacárido K), factores de coagulación, proteínas plasmáticas, quimioterapia antitumoral, amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam. Los resultados falsos negativos se relacionan con la existencia de sueros hiperpigmentados (bilirrubina y triglicéridos elevados), el tratamiento empírico o profilaxis antifúngica y las infecciones con especies que liberan poca cantidad de BG (Mucorales y *Cryptococcus* spp.).<sup>(11,30,42)</sup>

## Diagnóstico micológico mediante pruebas moleculares

Entre las técnicas moleculares que se utilizan en la identificación de hongos se describen: el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), la amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN (RAPD, del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*), 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 amplificación de diferentes fragmentos de ADN específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) y sus modificaciones. Entre estas últimas se destacan la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, del inglés *Real Time Polymerase Chain Reaction*) y la PCR anidada.<sup>(8,23)</sup>

La amplificación de dianas acoplada a la secuenciación de los productos amplificados permite una identificación más precisa de diferentes agentes, tanto directamente de muestras clínicas como a partir de cultivos.<sup>(9)</sup> A continuación se abordarán las técnicas moleculares más utilizadas en el diagnóstico micológico basadas en el formato PCR.

## Secuenciación de ácidos nucleicos fúngicos

El progreso creciente en la tecnología y la disponibilidad de las secuencias del genoma completo de muchos hongos facilitó la aplicación de métodos basados en las secuencias del ADN en la

investigación y el diagnóstico de diferentes microorganismos. La identificación se logra al comparar la secuencia del producto de amplificación que se obtiene a partir de muestras o cultivos con una base de datos de secuencias de especies conocidas. Es un método específico y rápido, por lo que se considera el candidato a convertirse en el prueba de referencia para la identificación de estos agentes.<sup>(8)</sup>

La diana que se emplea con mayor frecuencia es la que codifica el complejo de los ARN ribosomales (genes 5,8S, 18S y 28S). Estos genes contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos, dominios variables y regiones espaciadoras internas, altamente variables. En dependencia del objetivo del método se pueden emplear para detectar secuencias muy conservadas e inespecíficas o variables y muy específicas.<sup>(5)</sup>

#### a) Identificación de levaduras

La diferenciación por el método molecular es indiscutible para especies idénticas desde el punto de vista fenotípico. En los últimos años se reconocieron como patógenos humanos a *C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C. bracariensis* y *C. auris*; estas son fenotípicamente indistinguibles de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. haemulonii*, respectivamente. Así mismo, el género *Trichosporon* sufrió varias reclasificaciones; en particular *T. beigeli*, se desplegó en al menos 18 especies. Estos y otros hallazgos proporcionaron el desarrollo de la identificación molecular mediante secuenciación. Las dianas que se emplean con más frecuencia para identificar las levaduras son la región D1/D2 del 28S ADNr y los espacios de transcripción internos 1 y 2 del ADNr, conocidos como ITS, del inglés *internal transcribed spacer*.<sup>(5,45)</sup>

#### b) Identificación de hongos filamentosos

Para los hongos filamentosos, la secuenciación de los ITS resuelve menos especies que en el caso de las levaduras. Por ejemplo, para *Aspergillus* y *Scedosporium* se debe emplear el gen de la beta-tubulina y para *Fusarium* el que codifica para el factor de elongación alfa.<sup>(46,47,48)</sup>

### Sondas para la identificación de hongos patógenos

#### a) *Histoplasma capsulatum*

En este particular la PCR diagnóstica está más avanzada que en otras micosis endémicas.<sup>(38)</sup> Existen diferentes protocolos tanto de qPCR como convencional dirigidos a la amplificación de la región transcrita interna, ITS o de genes de copia única como el *Hc100p* o el *SCAR220*.<sup>(5)</sup> La sensibilidad y especificidad global de estos métodos fueron del 86 % y el 100 %, respectivamente, siendo más

sensibles los basados en qPCR, lo que depende de las características de los oligonucleótidos que se utilicen para la amplificación (Cuadro 2).<sup>(3,49)</sup>

**Cuadro 2** - Genes blancos y secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico molecular de la histoplasmosis<sup>(23)</sup>

Gen/tipo de PCR	Secuencia del cebador	Tamaño del producto (bp)	Sen/Esp (%)
18S rRNA/PCR anidada	5'-GTT AAA AAG CTC GTA GTT G-3' 5'-TCC CTA GTC GGC ATA GTT TA-3'	429	89/77
	5'-GCC GGA CCT TTC CTC CTG GGG AGC-3' 5'-CAA GAA TTT CAC CTC TGA CAG CCG A-3'	231	
Proteína 100kDa/PCR anidada	5'-GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC AAC-3' 5'-ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT-3'	391	69-100/90-100
	5'-GAG ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA-3' 5'-AGG AGA GAA CTG TAT CGG TGG CTT G-3'	210	
100kDa/PCR-EIA	5'-CGC AGT TTT CCG TGC AGA A-3' 5'-CCA CAG CAT CAC GGA GGT ATT-3'	99	7/100
Antígeno M/PCR	5'-ACA AGA GAC GAC GGT AGC TTC ACG-3' 5'-GCG TTG GGG ATC AAG CGA TGA GCC-3'	111	100/100
	5'-CGG GCC GCG TTT AAC AGC GCC-3' 5'-ACC AGC GGC CAT AAG GAC GTC-3'	279	
Antígeno H/PCR-semi-anidada	5'-GCG GGG TTG GCT CTG CTC T-3' 5'-TTG GAA ACC CCG GGC TTG-3' 5'-TCA TAG TAG GCT GTT CAC CCC CG-3'	330	No reportada
ITS-rRNA/PCR anidada*	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3' 5'-TCC TCC GCT TST TGS TST GC-3'	308	100
ITS1-rDNA/qPCR**	5'-CCA CCC TTG TCT ACC-3' 5'-GGA ACC AAG AGA TCC GT-3'	182	78-100/100

\*Combinado con: A (5'-CAC GCC GTG GGG GGC TGG GAG CCT-3' y 5'-CGG TGT CCC CGG CGG ACA CGG GCC C-3'), B (5'-GGG CCC GTG TCC GGG GAC ACC GG-3 y 5'-CCC GGA ATA TCC AGG GGG CGC AA-3'), y C (5'-TGA TTG GCG TCTGAGCAT G-3 y 5'-ATG GTG GGC RGGAGCCGCC-3').

\*\*Combinado con las sondas FRET: HC1-Fluos 5'-GTC GGT GAA CGA TTG GCG T-3' y HC1-Red 5'-LCRED640-GAG CAT GAG AGC GAT AAT AAT CCA GT-3'.

El advenimiento de estas técnicas trajo consigo avances importantes tanto en la localización de nuevas zonas endémicas como en el conocimiento de la relación paciente-fuente de infección. Hasta hace pocos años se describían tres variedades de la especie: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *faracininosum*. Las diferencias en las secuencias del ADN diferencian ocho clados: norteamericana clase 1 (clado 1); norteamericana clase 2 (clado 2); latinoamericana grupo A (clado 3); latinoamericana grupo B (clado 4); australiana (clado 5); holandesa (clado 6); eurasiática (clado 7) y: africana (clado 8). Estos conocimientos básicos tributan a una mejor comprensión de la epidemiología de la enfermedad que ocasiona.<sup>(23,50)</sup>

**b) *Aspergillus* spp.**

En los últimos años se diseñaron marcadores moleculares para el diagnóstico de la AI (Cuadro 3).

**Cuadro 3** - Marcadores moleculares desarrollados para el diagnóstico de aspergilosis invasiva<sup>(51)</sup>

Marcador molecular	Utilidad
Gen 18S del rARN	Detección de <i>Aspergillus</i> en muestras de sangre. Mayor sensibilidad 79 % y especificidad 92 % que el ELISA y la determinación de (1-3)-β-D-glucano Detección 100 % específica y sensible 61,7 % de <i>A. fumigatus</i> , por PCR-ELISA en modelo murino. Ensayo más sensible que la detección de galactomananos y la qPCR
Gen mtADN	Detección de <i>A. fumigatus</i> en biopsias y LBA. Sensibilidad 73 %, especificidad 93 %, VPP 73 % y VPN 95 %
Citocromo b mitocondrial	Detección específica de <i>A. fumigatus</i> y cuantificación de la carga fúngica en LBA y sangre. Sensibilidad de 13,2 fg de ADN
Gen 18S del rADN	Detección y cuantificación específica de ADN de <i>A. fumigatus</i> . Sensibilidad de 103 conidios/mL en modelo murino
Gen 28S del rADN	Detección de diversas especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Candida</i>
Secuencias parciales de los genes β-tubulina y rodlet A	Identificación específica y altamente reproducible de <i>A. fumigatus</i> de la sección <i>Fumigati</i>

El uso de estos marcadores permite el diagnóstico en las primeras fases de la enfermedad y diferenciar las especies de *Aspergillus* de importancia médica. Las pertenecientes a la sección *Fumigati*, con morfotipos casi indistinguibles al de *A. fumigatus*, tienen diferentes perfiles de susceptibilidad a los antifúngicos (Ej. *A. lentulus*) por lo que una mala identificación repercute en el tratamiento de los pacientes. Entre los inconvenientes para su aplicación se encuentra la baja reproducibilidad de la técnica entre los laboratorios.<sup>(51)</sup>

**c) *Candida* spp.**

Existen varios procedimientos para la identificación de especies de *Candida* a partir de amplificaciones por PCR. Además de los genes ribosomales (5.8S y 18S rARN), también se utilizan las secuencias ITS con resultados satisfactorios. Estas pruebas se caracterizan por ser rápidas y fieles (sensibilidad del 70-100% y especificidad del 98-100%). Los resultados se alcanzan en menos de 10 horas independientemente de la variante. La desventaja es que los oligonucleótidos que utilizan son “universales” y amplifican fragmentos de ADN de tamaños similares que están conservados en todas las especies de *Candida*. La combinación de la PCR con el RFLP permite obtener perfiles particulares de acuerdo con la especie o aislado. Esta metodología diferencia 16 especies de levaduras de importancia clínica, entre ellas *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y *C. auris*.<sup>(7,52)</sup>

**d) *Cryptococcus* spp.**

Las pruebas moleculares para la identificación y diferenciación del complejo *C. neoformans* /*C. gattii* permiten agrupar las especies de dicho complejo de acuerdo con sus patrones moleculares.

Entre estas técnicas se destacan la PCR con iniciadores universales como el M13, (GACA)<sup>4</sup> y (GTG)<sup>5</sup>, el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP), el RFLP de los genes *URA5* y *PLB1*, así como la tipificación de secuencias multilocus o MLST, de siete genes conservados (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* y *IGS1*).<sup>(53,54)</sup>

Hoy se reconocen 10 genotipos: VNI/AFLP1, VNII/ VNIB/AFLP1A, VNII/AFLP1B, VNIV/AFLP2, VNIII/ AFLP3, VGI/AFLP4, VGII/AFLP6, VGIV/AFLP10, VGIII/AFLP5 y VGIV/AFLP7. Este hallazgo y otras diferencias en cuanto a la fisiología, los perfiles de susceptibilidad *in vitro*, la patogenicidad y las manifestaciones clínico-epidemiológicas, entre otros aspectos, sustentan la propuesta de elevar a nivel de especie a cada uno.<sup>(53,54)</sup>

#### e) *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*

Entre las técnicas moleculares disponibles para la identificación de *Coccidioides*, a partir de exudados, tejido fresco, tejido embebido en parafina y tejido fijado con formalina, se encuentran la PCR anidada y la qPCR.<sup>(55)</sup> La primera es capaz de amplificar un fragmento de 340 pb del gen que codifica el antígeno específico Ag2/PRA con la que se alcanza un 98 % de sensibilidad y un 100 % de especificidad.<sup>(56)</sup> La segunda, se basa en la identificación de un fragmento de 170 pb de la región ITS2 con una sensibilidad y especificidad del 100 % y 98,4 %, respectivamente, en muestras de tracto respiratorio. Estos valores son ligeramente inferiores en tejidos frescos (92,9 y 98,1 %) y en tejidos parafinados (73,4 y 100 %).<sup>(57)</sup>

La diferenciación entre *C. immitis* y *C. posadasii* alcanza su máximo valor en los estudios clínico-epidemiológicos. Esto es posible con el empleo de sondas *Taqman* para la amplificación de las secuencias blanco prolina 157, prolina 174 y glucosa sintetasa 192.<sup>(58)</sup>

### Detección de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos

Existen varias pruebas para detectar los mecanismos de resistencia en aislados e incluso directamente de muestras clínicas. Varias alteraciones de los genes *ERG11* en levaduras y *CYP51* en hongos filamentosos se relacionan con la pérdida de actividad de los azoles. Entre estas se destacan las mutaciones puntuales, la sobreexpresión del gen, la amplificación debida a la duplicación cromosómica, la conversión genética y la recombinación mitótica. Las más frecuentes son las primeras, las cuales se detectan mediante técnicas de PCR.<sup>(59,60,61)</sup>

Otro mecanismo frecuente en levaduras es la reducción de las concentraciones intracelulares de los azoles. Estas están mediadas por la sobreexpresión de los genes que codifican para las bombas de expulsión: los transportadores ABC (del inglés *ATP binding cassette*) y los MFS (del inglés *major facilitators superfamily*).<sup>(45)</sup>

La resistencia a caspofungina y otras equinocandinas suelen deberse a mutaciones de los genes de la vía de la síntesis de glucano, en especial en el gen *FSK1*, las cuales pueden detectarse en aislados clínicos mediante PCR múltiple en tiempo real.<sup>(45)</sup>

También se describen marcadores moleculares que detectan mutaciones asociadas con resistencia a triazoles en *A. fumigatus* (Cuadro 4). Sin embargo, su uso está limitado debido a que en la misma secuencia del gen *cyp51* pueden existir otras mutaciones asociadas con la resistencia.<sup>(51)</sup>

Cuadro 4 - Marcadores moleculares para detectar resistencia en aislados de *A. fumigatus*<sup>(51)</sup>

Marcador molecular	Detección de resistencia para
<i>L98H</i> en <i>cyp51</i>	Itraconazol y posaconazol
<i>M220</i> en <i>cyp51</i>	Itraconazol
<i>G54</i> en <i>cyp51</i>	Itraconazol y posaconazol
<i>G54</i> , <i>L98</i> , <i>220</i> , <i>G13</i> y una repetición consecutiva de 34 bp en <i>cyp51</i>	Resistencia cruzada a azoles
<i>P216</i> y <i>F219</i>	Itraconazol y posaconazol

### Tipificación subespecífica de aislados clínicos

Los métodos de tipificación molecular se aplican para analizar brotes de infección intrahospitalaria y en estudios de genética poblacional. Entre otras, se emplean el análisis de isoenzimas y otras técnicas basadas en la PCR como el RFLP, el RAPD, el SSDP (del inglés, *sequence-specific DNA primers*), el PMM (del inglés, *polymorphic microsatellite markers*) y el MLST el cual se basa en la secuenciación de varias dianas. Algunas discriminan solo entre subespecies y otras son capaces de distinguir entre aislados individuales.<sup>(45)</sup>

### Espectrometría de masas en el diagnóstico fúngico

En la última década la espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization-Time-of-Flight*) se introdujo en el campo de la microbiología para la identificación de diferentes agentes. Esta técnica permite la obtención de una huella peptídica como resultado de la ionización suave de las proteínas ribosomales, lo cual crea un espectro de masas que es especie específico y permite crear bases de datos con los patrones que presenta cada una.<sup>(8,62)</sup>

Durante el proceso, el espectro del agente a identificar se compara automáticamente con la base de datos de referencia y el resultado se emite a través de un puntaje de similitud entre ambos. La identificación puede hacerse directamente a partir de los aislados o de sangre y orina. La técnica es

de fácil implementación, confiable, rápida y precisa para la identificación de especies fúngicas de importancia médica.<sup>(8,62,63)</sup>

La comparación entre los métodos convencionales y el MALDI-TOF demuestra que este permite identificar de forma correcta 27,5 % más aislados filamentosos hasta 50 veces más rápido; esta ventaja se amplía aun más al emplearse directamente muestras de hemocultivos, lo que permite seleccionar el tratamiento antifúngico apropiado de forma oportuna. A pesar del importe relativamente elevado del equipo, el precio de la identificación por muestra está por debajo de 1,35 € lo que lo hace costo efectivo.<sup>(8,62)</sup>

## **Conclusiones**

La aparición de especies emergentes, el desarrollo de resistencia a los antifúngicos y de forma especial las dificultades para el diagnóstico certero y oportuno condicionan que las micosis se ubiquen entre las diez primeras causas de morbimortalidad en el mundo. El desarrollo biotecnológico aporta nuevas herramientas que incrementan las oportunidades de su identificación y hoy disponemos de métodos basados tanto en la detección de marcadores inmunológicos como de elementos moleculares específicos. Entre los primeros, las pruebas inmunocromatográficas parecen imponerse como métodos de diagnóstico rápido por sus ventajas, en tanto los avances de la biología molecular permitieron el desarrollo de sistemas rápidos con sensibilidad y especificidad elevadas capaces de identificar una gran variedad de agentes fúngicos que facilita el inicio oportuno del tratamiento específico. De manera general, la principal desventaja de estos son sus costos relativamente elevados y en ocasiones la necesidad de infraestructura con condiciones especiales para obtener los resultados esperados.

## **Referencias bibliográficas**

1. Arenas R. La micología médica y sus retos en el siglo XXI. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2012;40(5):129-130.
2. Godoy P. Generalidades sobre micología. En: Riera F, Celi AP, Thompson L, editores. *Infecciones fúngicas sistémicas.* 2da ed. Ecuador: Asociación Panamericana de Infectología; 2017. p. 15-36.

3. Hernández Hernández F, Tovar Torres J, Sánchez Paredes E, Tovar Torres C, Martínez Aguilar M. Memorias del simposio: avances en el diagnóstico de la candidosis y otras micosis invasivas. *Dermatol Rev Mex.* 2018;62(4):347-366.
4. The Global Action Fund For Fungal Infections (GAFFI) [Internet]. The Global Action Fund For Fungal Infections (GAFFI) Will # Fightfungus with global awareness campaign [citado el 29 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.gaffi.org/the-global-action-fund-for-fungal-infections-gaffi-will-fightfungus-with-global-awareness-campaign/>
5. Gago Prieto S. Desarrollo y validación de técnicas de diagnóstico de infección fúngica invasora [tesis doctoral]. España: Universidad Complutense de Madrid; 2014.
6. Rabagliati R. Actualización en el diagnóstico y manejo de aspergilosis invasora en pacientes adultos. *Rev Chilena Infectol.* 2018;35(5):531-544.
7. Hernández Hernández F. Las micosis invasivas en países desarrollados. Memorias del simposio: avances en el diagnóstico de la candidosis y otras micosis invasivas. *Dermatol Rev Mex.* 2018;62(4):347-366.
8. Tangarife-Castaño VJ, Sindy V, Flórez-Muñoz SV, Mesa-Arango AC. Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares. *Medicina & Laboratorio.* 2015;21(5,6):211-242.
9. Morales-Restrepo N, Cardona-Castro N. Métodos de diagnóstico en micología. *Rev CES Med.* 2018;32(1):41-52.
10. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualization 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(1):39.e1–39.e15.
11. Prattes J, Heldt S, Eigl S, Hoenigl M. Point of Care Testing for the Diagnosis of Fungal Infections: Are We There Yet? *Curr Fungal Infect Rep.* 2016;10:43-50.
12. Quindós G, Eraso E, López-Soria LM, Ezpeleta G. Enfermedad fúngica invasora: ¿Diagnóstico micológico convencional o molecular? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(9):560-571.
13. Montero A, Gilsanz F, Maseda E. Aproximación diagnóstica y terapéutica a la candidiasis intraabdominal. *Rev Esp Quimioter.* 2016;29(1):52-55.
14. Martínez Jiménez M. Evaluación de biomarcadores serológicos de candidiasis invasiva para su aplicación clínica [tesis doctoral]. España: Universidad Complutense de Madrid; 2017.

15. Pitarch A, Nombela C, Gil C. Serum antibody signature directed against candida albicans hsp90 and enolase detects invasive candidiasis in non-neutropenic patients. J Proteome Res. 2014;13:5165-5184.
16. Casquero J, Urcia F, Sánchez E. Antígenos nativos de *Aspergillus fumigatus* con utilidad para el inmunodiagnóstico de aspergiloma. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2009;26(2):182-86.
17. Beltrán Rodríguez N, San Juan-Galán JL, Fernández Andreu CM, Yera DM, Barrios Pita M, Perurena Lancha MR, et al. Chronic Pulmonary Aspergillosis in Patients with Underlying Respiratory Disorders in Cuba-A Pilot Study. J Fungi. 2019;5(18). doi:10.3390/jof5010018
18. Fernández de Córdova-Aguirre JC, Velasco-Medina AA, Cariño-Cartagena DA, Velázquez-Sámano G. Aspergilosis broncopulmonar alérgica. Revista Alergia México. 2014;61:121-126.
19. Barrera C, Richaud-Thiriez B, Rocchi S, Rognon B, Roussel S, Grenouillet F, et al. New commercially available IgG kits and time-resolved fluorometric IgE assay for diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. Clin Vaccine Immunol. 2016;23:196-203.
20. Dumollard C, Bailly S, Perriot S, Brenier-Pinchart MP, Saint-Raymond C, Camara B, et al. Prospective evaluation of a new *Aspergillus* IgG enzyme immunoassay kit for diagnosis of chronic and allergic pulmonary aspergillosis. J Clin Microbiol. 2016;54:1236-42.
21. Richardson M, Page I. Role of Serological Tests in the Diagnosis of Mold Infections. Current Fungal Infection Reports. 2018;12:127-136. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12281-018-0321-1>
22. Zhang X, Gibson B, Jr, Daly TM. Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of histoplasmosis infection in immunocompromised patients. J Clin Microbiol. 2013;51:4095-101.
23. Muñoz CO, Cano LE, González A. Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. Infectio. 2010;14(S2):S145-S158.
24. Fernández Andreu CM, Illnait Zaragozí MT, Martínez Machín G, Perurena Lancha MR, Monroy Vaca E. Una actualización acerca de histoplasmosis. Rev Cubana Med Trop. 2011;63(3):189-205.

25. Moriones Robayo CA, Guerra Ortiz CP. Histoplasmosis laríngea: reporte de primer caso en Colombia. Colombia Médica. 2014;45(4):186-189.
26. Nguyen C, Barker BM, Hoover S, Nix DE, Ampel NM, Frelinger JA, et al. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of coccidioidomycosis. Clin Microbiol Rev. 2013;26:505-25.
27. Higueta-Gutiérrez LF, Quintero-Quinchía C, Madera-Miranda IC, Cardona-Arias JA. Metanálisis de pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la infección por *Paracoccidioides*, 1972- 2017. Infectio. 2019;23(2):167-174.
28. Arango A, Moreno N. Diagnóstico micológico: del examen directo a los métodos moleculares. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2012;20(1):76-82.
29. Pontón J. El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. Rev Iberoam Micol. 2006;23:20-25.
30. Vidal García M. Análisis de bis(metilglicol)gliotoxina como biomarcador para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora. Validez de su detección serológica y distribución dentro del género *Aspergillus* [tesis doctoral]. España: Universidad de Zaragoza; 2017.
31. Delama I, Legarraga P, González T, García P, Rabagliati R. Evaluación del *Aspergillus lateral flow device* para el diagnóstico de aspergilosis invasora, experiencia en un hospital universitario. Rev Chilena Infectol. 2018;35(5):574-579.
32. Miceli MH, Goggins MI, Chander P, Sekaran AK, Kizy AE, Samuel L, et al. Performance of lateral flow device and galactomannan for the detection of *Aspergillus* species in bronchoalveolar fluid of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. Mycoses. 2015;58(6):368-74. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/myc.12327>
33. González Cuellar FE. Diagnóstico por laboratorio de las infecciones por hongos. Rev Fac Cienc Salud Univ Cauca. 2005;7(1):42-45.
34. Tello M, Gutiérrez E, Béjar V, Galarza C, Ramos W, Ortega-Loayza AG. Criptococosis. Rev Méd Risaralda. 2013;19(2):147-153.
35. Lee G-H, Arthur I, Leung M. False-negative serum Cryptococcal Lateral Flow Assay Result due to the prozone phenomenon. J Clin Microbiol. 2018;56(4):e01878-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.01878-17>
36. Drain PK, Hong T, Krows M, Govere S, Thulare H, Wallis C, et al. Validation of clinic-based cryptococcal antigen lateral flow assay screening in HIV-infected adults in South Africa. Scientific Reports. 2019;9(2687). Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37478-7>

37. Theel ES, Jespersen DJ, Haring J, Mandrekar J, Binnicker MJ. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen from urine specimens. J Clin Microbiol. 2013;51:3555-9.
38. Gómez BL. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: advances and challenges. Rev Iberoam Micol. 2014;31:35-41.
39. Nacher M, Blanchet D, Bongomin F, Chakrabarti A, Couppié P, Demar M, et al. *Histoplasma capsulatum* antigen detection tests as an essential diagnostic tool for patients with advanced HIV disease in low and middle income countries: A systematic review of diagnostic accuracy studies. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(10):e0006802. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006802>
40. Cáceres DH, Gómez BL, Tobón AM, Chiller TM, Lindsley MD. Evaluation of a *Histoplasma* antigen lateral flow assay for the rapid diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis in Colombian patients with AIDS. Mycoses. 2019;63(2):139-144. <https://doi.org/10.1111/myc.13023>
41. Biesbroek JM, Verduyn Lunel FM, Kragt JJ, Amelink GJ, Frijns CJ. Culture-negative *Candida* meningitis diagnosed by detection of *Candida* mannan antigen in CSF. Neurology. 2013;81(17):1555-6.
42. Miceli MH, Maertens J. Role of non-culture-based tests, with an emphasis on galactomannan testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. Semin Respir Crit Care Med. 2015;36(5):650-61.
43. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for Invasive Fungal Infections. Clin Microbiol Rev. 2014;27(3):490-526.
44. Arvanitis M, Mylonakis E. Diagnosis of invasive aspergillosis: recent developments and ongoing challenges. Eur J Clin Invest. 2015;45(6):646-52.
45. Rodríguez-Tudela JL, Cuesta I, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M. Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26(13):47-53.
46. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. *Aspergillus* section fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:1244-51.
47. Gilgado F, Cano J, Gene J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria*

*boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. J Clin Microbiol. 2008;46:766-71.

48. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JI. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. J Antimicrob Chemother. 2008;61:805-809.

49. Buitrago MJ, Canteros CE, Frias De León G, González A, Marques-Evangelista De Oliveira M, Muñoz CO, et al. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. Rev Iberoam Micol. 2013;30:256-60.

50. Messina FA, Corti M, Negroni R, Arechavala A, Bianchi M, Santiso G. Histoplasmosis en pacientes con SIDA sin manifestaciones cutáneo-mucosas. Rev Chilena Infectol. 2018;35(5):560-565.

51. Frías-de León MG, Acosta-Altamirano G, Duarte-Escalante E, Martínez-Hernández JE, Martínez-Rivera M, Reyes-Montes M. Marcadores moleculares: una herramienta importante en el diagnóstico, tratamiento y epidemiología de la aspergilosis invasora. Cir Cir. 2014;82:109-18.

52. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for healthcare facilities and laboratories around *C. auris* [acceso: 18/09/2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/recommendations.html>

53. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. Fungal Genet Biol. 2015;78:16-48. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>

54. Hagen F, Lumbsch HT, Arsic Arsenijevic V, Badali H, Bertout S, Billmyre RB, et al. Importance of resolving fungal nomenclature: the case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* genus. mSphere. 2017;2(4):e00238-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00238-17>

55. López Tello JB. Ensayos de obtención de fragmentos vNAR para la detección de *Coccidioides* spp. [tesis de maestría]. México; 2018.

56. Martínez Cepeda G, Revelo Ruales A. Coccidioidomicosis en caninos y felinos: hallazgos clínicos, diagnóstico y tratamiento. Analecta Vet. 2018;38(1):33-44. Disponible en: <https://doi.org/10.24215/15142590e023>

57. Binnicker MJ, Buckwalter SP, Eisberner JJ, Stewart RA, McCullough AE, Wohlfiel SL, et al. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real time PCR. J Clin Microbiol. 2007;45:173-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.0177606>

58. Castañón-Olivares LR, Güereña-Elizalde D, González-Martínez MR, Licea-Navarro AF, González-González GM, Aroch-Calderón A. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;111:326-35. Disponible en: <https://doi.org/10.1196/annals.1406.047>
59. Balashov SV, Gardiner R, Park S, Perlin DS. Rapid, high-throughput, multiplex, real-time PCR for identification of mutations in the Cyp51a gene of *Aspergillus fumigatus* that confer resistance to itraconazole. *J Clin Microbiol.* 2005;43:214-22.
60. Mellado E, García-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, *et al.* A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring *in vitro* cross-resistance to azole antifungals involves a combination of Cyp51a alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1897-904.
61. García-Effron G, Dilger A, Alcázar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS. Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1200-6.
62. Relloso MS, Nieves J, Fares Taie S, Farquharson V, Mujica MT, Vanesa Romano V, *et al.* Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Rev Argent Microbiol.* 2015;47(2):103-7.
63. Oviaño García M, Rodríguez Sánchez B, Caballero Pérez JdD, Muñoz Bellido JL. Aplicaciones del MALDI-TOF en la identificación de levaduras y hongos filamentosos. En: Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editores. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica.* España: Seimc; 2019. p. 22-4. [acceso: 18/09/2019]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia65.pdf>

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### Contribuciones de los autores

Elizabeth Fuentes Feria: Realizó la búsqueda de la información y redactó el manuscrito.

María Teresa Illnait-Zaragozí: Guió el trabajo y realizó la revisión del manuscrito.