

Diagnóstico microbiológico de las micosis

José Pontón

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

El diagnóstico microbiológico es un paso esencial en el establecimiento de la etiología de las enfermedades infecciosas y aunque su característica fundamental es la identificación del agente etiológico, en la actualidad incluye también la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos y la utilización de métodos de tipado que permitan la diferenciación intraespecífica de los aislamientos. Siempre que sea posible, la identificación de los aislamientos fúngicos debe de realizarse a nivel de especie, ya que esta información puede ser muy importante para orientar el tratamiento antifúngico hasta que se dispongan de los resultados de sensibilidad *in vitro*. Un ejemplo de esta necesidad lo tenemos con el género *Scedosporium*, donde *Scedosporium apiospermum* es sensible al miconazol, voriconazol, posaconazol y ravuconazol, mientras que *Scedosporium prolificans*, una especie muy relacionada, es resistente a la mayoría de los antifúngicos [1,2].

En el diagnóstico micológico se están produciendo avances importantes que están permitiendo un diagnóstico más rápido y eficiente. La velocidad en la obtención de este diagnóstico es un aspecto fundamental en la medicina actual, ya que un diagnóstico rápido posibilitará la prescripción de un tratamiento antifúngico específico que permitirá un uso racional de los antifúngicos y limitará el desarrollo de resistencias. Aunque todavía no existe un consenso sobre el tema, el tiempo ideal para que el clínico pueda utilizar los datos del diagnóstico micológico para guiar el tratamiento antifúngico varía según el tipo de paciente. Así, en pacientes ambulatorios los resultados diagnósticos se necesitan en tiempo real (menos de 10 min), ya que el paciente dejará la consulta con el tratamiento y no volverá a una nueva consulta hasta días después, mientras que en pacientes hospitalizados los resultados diagnósticos serán necesarios lo antes posible, aunque el establecimiento de una terapia empírica permitirá disponer de más tiempo para realizar el diagnóstico.

Diagnóstico en tiempo real

Las posibilidades de obtener resultados en tiempo real (menos de 10 min) en el diagnóstico micológico actual son limitadas y se centran en la observación directa de la muestra tomada del paciente. Este tipo de diagnóstico, que probablemente se beneficiará del desarrollo de nuevas tecnologías, se basa actualmente en la observación microscópica directa de la muestra o utilizando tinciones de rápida realización como la tinta china, el blanco de calcoflúor y otros fluorocromos, o la tinción de Gram y es de gran utilidad en el estudio de muestras clínicas de pacientes con micosis que afectan a la piel y mucosas [3,4], pero también puede ser de utilidad en el diagnóstico de micosis invasoras como la meningoencefalitis criptocócica y algunas infecciones por hongos filamentosos (Figura 1) [4,5]. Las principales limitaciones de las técnicas microscópicas son su relativamente baja sensibilidad, su incapacidad, en la mayor parte de los casos, para identificar el hongo a nivel de especie y la imposibilidad de realización de estudios de sensibilidad a los antifúngicos.

Diagnóstico rápido

La obtención de resultados entre las cinco y ocho horas que siguen a la toma de la muestra clínica abre un gran abanico de posibilidades al diagnóstico micológico. Una de las técnicas tradicionales en el diagnóstico de algunas micosis profundas cuando pueden obtenerse líquidos orgánicos es la realización de estudios microscópicos para poner de manifiesto la presencia del hongo en las muestras obtenidas utilizando tinciones como la de Plata-Metenamina y Giemsa (Figura 2). El rendimiento de estas técnicas es variable y depende de la concentración de los elementos fúngicos en la muestra pudiéndose obtener un aumento de la sensibilidad utilizando fluorocromos y anticuerpos [4,5].

Existe una amplia experiencia en la utilización de técnicas serológicas en el diagnóstico de las micosis, empleándose generalmente en el diagnóstico de las micosis invasoras más importantes [6,7]. Las técnicas serológicas permiten la detección tanto de antígenos fúngicos como de la respuesta de anticuerpos que se produce durante el desarrollo de la micosis, y aunque normalmente se utilizan de forma independiente, existen evidencias recientes de que su utilización combinada puede aumentar la sensibilidad del diagnóstico de la candidiasis invasora [8]. La detección de anticuerpos es de utilidad en el diagnóstico de la candidiasis invasora, aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma, blastomycosis, histoplasmosis y paracoccidioidomycosis (Tabla 1), y requiere del funcionamiento apropiado de la respuesta humoral, por lo que se suele utilizar el diagnóstico de las micosis en pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, si se utilizan técnicas lo suficientemente sensibles, es posi-

Dirección para correspondencia:

Dr. José Pontón
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco
Apartado 699, E-48080 Bilbao, España
Tel.: 94-6012855
Fax: 94-4649266
E-mail: oipposaj@lg.ehu.es

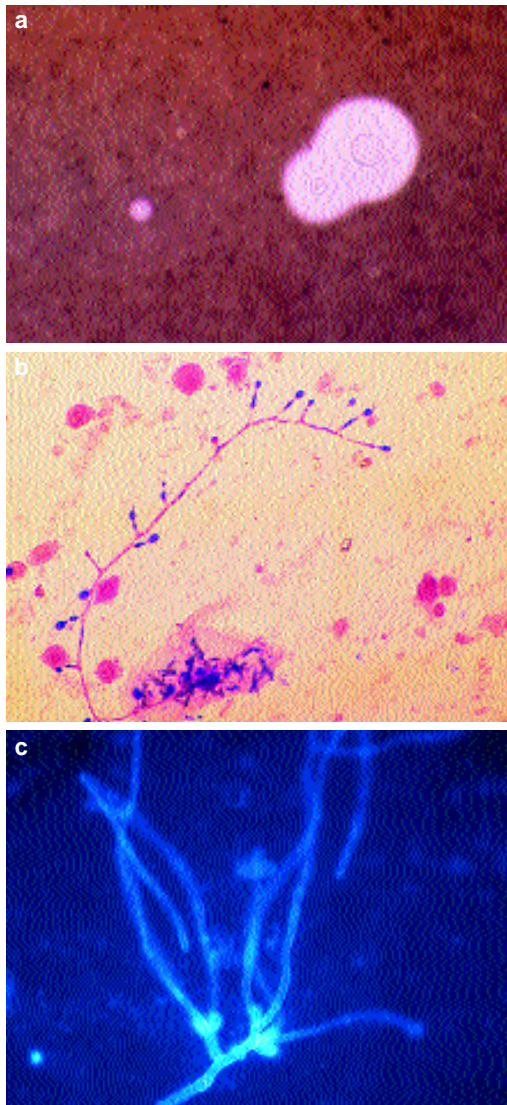


Figura 1. Tinciones que permiten realizar el diagnóstico micológico en tiempo real. a: Tinta china en LCR de un paciente con meningitis criptocócica; b: Gram en esputo de un paciente con infección por *S. prolificans*; c: Calcoflúor en un paciente con colangitis por *A. fumigatus*. Reimpreso con el permiso de los autores y de la editorial Revista Iberoamericana de Micología.

ble detectar niveles de anticuerpos de utilidad diagnóstica en algunos grupos de pacientes inmunocomprometidos con candidiasis invasora [6]. En la mayoría de las micosis se está mejorando el diagnóstico basado en la detección de anticuerpos con la utilización de antígenos recombinantes, ya que están aumentando la especificidad de las pruebas al disminuir las reacciones cruzadas [9]. Estudios recientes realizados en diferentes grupos de pacientes han demostrado que la detección de anticuerpos antimicelio es de utilidad en el diagnóstico de la candidiasis invasora [10-13] (Figura 2). Con independencia de la técnica utilizada, existe consenso sobre la utilidad de la determinación de los títulos de anticuerpos en muestras seriadas, ya que facilita el diagnóstico y permite realizar un seguimiento de la evolución del paciente.

La detección de antígenos fúngicos puede permitir un diagnóstico temprano de las micosis invasoras ya que, a diferencia de la detección de la respuesta de anticuerpos, no necesita el tiempo de inducción de la respuesta inmune y su detección no se ve influenciada por el estado inmuno-

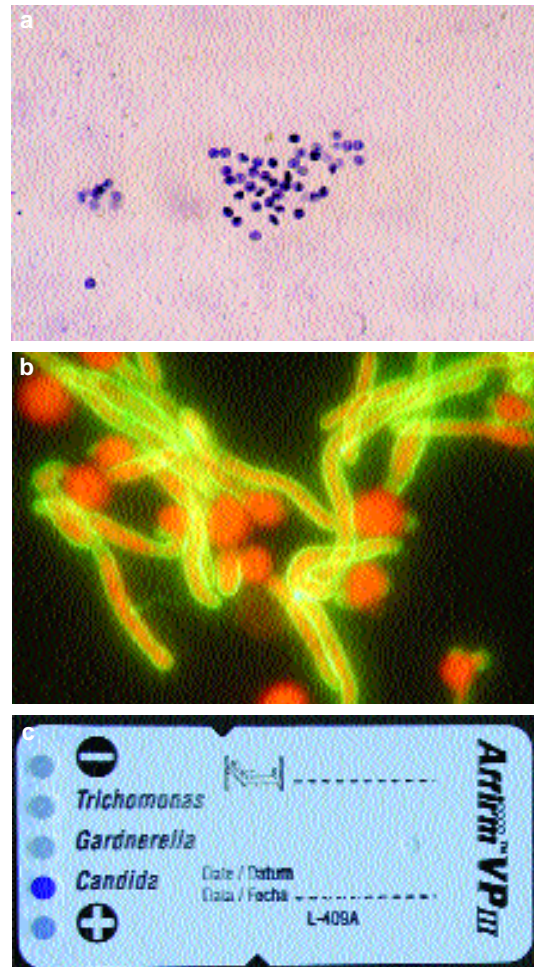


Figura 2. Técnicas que permiten realizar el diagnóstico micológico rápido. a: Tinción plata-metamina en LBA de un paciente con neumocistosis; b: Anticuerpos antimicelio en un paciente con candidiasis invasora; c: Sonda para el diagnóstico de la vulvovaginitis candidiásica. Reimpreso con el permiso de los autores y de la editorial Revista Iberoamericana de Micología.

Tabla 1. Utilidad de la serología en el diagnóstico de las micosis.

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

lógico del paciente. Este tipo de diagnóstico se ha desarrollado para la mayoría de las micosis invasoras y ha demostrado una gran utilidad en el diagnóstico de la histoplasmosis, la criptococosis y la aspergilosis (Tabla 1). La detección de antígeno capsular en pacientes con meningitis criptocócica es la prueba modelo de detección de antígeno debido a su rapidez (10-15 min), sencillez técnica y especificidad [3]. Los avances más importantes en el

campo de la detección de antígeno se han realizado en el diagnóstico de la aspergilosis invasora en pacientes hematólogicos mediante la detección de galactomanano con el Platelia Aspergillus, ya que permite una detección de la micosis más precoz que con otros métodos diagnósticos y puede ser útil para el seguimiento de la eficacia del tratamiento antifúngico [14,15]. La detección de antígeno en pacientes con candidiasis invasora continúa en desarrollo y se ha comercializado recientemente un ELISA para la detección de manano que presenta una buena especificidad pero una baja sensibilidad. Un aumento de la sensibilidad puede lograrse mediante la detección combinada de manano y anticuerpos antimanano [8].

Una alternativa similar a la detección de antígeno es la detección de componentes no antigénicos como el D-arabinol, el (1→3)-β-D-glucano y el ADN. En general, esta alternativa se encuentra en estudio y las pruebas comercializadas que existen para la detección de algunos de estos componentes son muy poco utilizadas en la actualidad. El D-arabinol es un metabolito producido por *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida kefyr* que puede ser detectado en pacientes con candidiasis invasora mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas o mediante un método enzimático comercializado [6]. Los niveles de D-arabinol deben ajustarse con los de creatinina o los de L-arabinol para corregir las elevaciones de arabinol debidas a alteraciones en la función renal. El glucano es un componente de la pared celular fúngica que se libera durante la infección y puede detectarse en el suero de pacientes con varias micosis (candidiasis, aspergilosis y neumocistosis, pero no criptococosis) utilizando dos sistemas comercializados (Fungitec G test, Seikagaku Kogyo Corporation, Japón y Wako WB003 test, Wako Pure Chemical Industries, Japón) [6]. Cuando es positiva, la prueba puede utilizarse como marcador de infección fúngica pero no permite identificar la especie.

La detección de ADN fúngico en la muestra clínica es una posibilidad que está siendo estudiada en profundidad en el diagnóstico de las micosis invasoras, no existiendo todavía pruebas comercializadas para su realización. Esta detección puede realizarse básicamente por dos técnicas: la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias conservadas en todos los hongos (PCR panfúngica) o de secuencias específicas de una especie concreta (PCR específica), y la utilización de sondas de ADN. En la mayor parte de los estudios hay una tendencia hacia la realización de la PCR panfúngica, que es muy sensible pero presenta una especificidad variable [16]. La utilización de sondas de ADN permite un diagnóstico muy específico pero relativamente poco sensible y aunque se utilizan fundamentalmente para la identificación de los hongos presentes en muestras tisulares, existe una prueba comercializada para el diagnóstico de la candidiasis vaginal (Affirm VPIII, Beckton-Dickinson, EE.UU.) [17] (Figura 2).

Diagnóstico en más de 24 horas

El cultivo de la muestra clínica es el método más utilizado en el diagnóstico de las micosis, ya que una vez aislado el hongo puede realizarse la identificación a nivel de especie, los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y los estudios de caracterización intraespecífica. Como contrapartida a sus grandes ventajas, es el diagnóstico más lento, ya que, suele ser incapaz de dar resultados antes de 24 h, porque hay que sumar al tiempo necesario para que crezca el hongo el que se requiere para la identificación. El tiempo de crecimiento fúngico está genética-

mente determinado y puede variar desde unas pocas horas a varios días. En general, las levaduras pueden detectarse tras 24-48 h de cultivo, mientras que los hongos filamentosos necesitan más tiempo y pueden presentar grandes diferencias entre ellos. Por ejemplo, *Mucor* y *Rhizopus* producen colonias visibles en 48 h mientras que *Histoplasma capsulatum* y otros hongos dimórficos requieren entre 5 y 21 días (Tabla 2) [18].

Tabla 2. Tiempo de crecimiento de los hongos a partir de muestras clínicas. Modificado de Morris *et al.* (18).

Especies	Nº de días para la detección		
	N	Media	Máximo
<i>Candida albicans</i>	191	3	14
<i>Aspergillus</i> spp.	64	5	21
<i>Candida</i> spp. (no <i>C. albicans</i>)	45	3	12
<i>Penicillium</i> spp.	25	6	23
<i>Torulopsis glabrata</i>	21	3	6
<i>Cryptococcus neoformans</i>	10	4	11
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	5	16	33
<i>Cladosporium</i> spp.	5	7	14
<i>Fusarium</i> spp.	4	4	5
<i>Paecilomyces</i> spp.	4	9	20
<i>Trichosporon beigelii</i>	4	3	4
<i>Bipolaris</i> spp.	3	4	4
<i>Acremonium</i> spp.	2	4	4
<i>Cunninghamella</i> spp.	2	4	4
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	2	5	6
<i>Rhodotorula</i> spp.	2	5	5
<i>Coccidioides immitis</i>	1	4	4
Otros ^a	13	8	2-22
Total	612	37	33

^aIncluye aislamientos de *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Chrysosporium*, *Cryptococcus albidus*, *Curvularia*, *Geotrichum*, *Malbranchea*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhizopus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Verticillium*.

Una vez que se ha aislado el hongo en cultivo se realiza la identificación a nivel de especie, encontrándose diferencias importantes en el tiempo que se requiere para identificar los hongos filamentosos y los levaduriformes. La identificación de los hongos filamentosos se basa fundamentalmente en criterios morfológicos [19] y su rapidez depende del tiempo que tarda el hongo en formar las estructuras que se utilizan para la identificación. Los hongos levaduriformes se identifican mediante criterios morfológicos y fisiológicos, siendo, en general, más rápida que la de los filamentosos (Tabla 3). Las pruebas más utilizadas son las que se basan en la asimilación de azúcares y otros compuestos (Figura 3), que por basarse en el crecimiento fúngico, necesitan entre 15 y 72 h [20]. Sin embargo, están comercializándose pruebas basadas en la detección de actividades enzimáticas y pruebas inmunológicas que permiten una identificación rápida de las levaduras más importantes en clínica (Tabla 3).

Un avance importante en la identificación de los hongos levaduriformes y de algunos dermatofitos son los medios diferenciales, ya que permiten la identificación por el color y la morfología de las colonias [21]. Cuando se utilizan como medios de aislamiento primario puede realizarse una identificación de algunas especies de *Candida* en 24-48 h. Los medios diferenciales se dividen en fluorogénicos, cuando las enzimas del hongo degradan componentes del medio que dan lugar a compuestos fluorescentes, y cromogénicos, cuando la actividad enzimática del hongo se detecta porque se producen colonias con un color característico. Los medios cromogénicos son los más utilizados porque no necesitan luz ultravioleta para la observación de las colonias y porque pueden identificar

Tabla 3. Pruebas para la identificación de hongos levaduriformes.

Prueba	N de especies Identificadas	Inoculación	Tiempo	Lectura
MUAG test	1	Manual	3min	Visual
Albistrip	1	Manual	5min	Visual
Albicans-Sure	1	Manual	5min	Visual
BactiCard Candida	1	Manual	5min	Visual
Bichrolatex Albicans	1	Manual	5min	Visual
Krusei color	1	Manual	5min	Visual
MUREX <i>C. albicans</i> CA50	1	Manual	30min	Visual
Fongiscreen	4	Manual	4h	Visual
Rapid Yeast Identification Panel	40	Automática	4h	Automática
RapidID yeast Plus	43	Manual	4-5h	Automática
Vitek 2 ID-YST	51	Automática	15h	Automática
Vitek 2 YBC	36	Automática	24-48h	Automática
Auxacolor	26	Manual	24-48h	Visual
Fungichrom I	23	Manual	24-48h	Visual
API Candida	15	Manual	24-48h	Visual
Fungifast I twin	10	Manual	24-48h	Visual
ID32C	63	Manual	24-72h	Automática
YT Microplate	63	Automática	24-72h	Automática
API 20C AUX	43	Manual	24-72h	Visual



Figura 3. Técnicas que permiten realizar el diagnóstico micológico en más de 24 h. a: Prueba para la identificación bioquímica de un hongo levaduriforme; b: Cultivo en medio cromogénico. Reimpreso con el permiso de los autores y de la editorial Revista Iberoamericana de Micología.

un número mayor de especies que los fluorogénicos (Figura 3).

Aunque en su mayor parte son todavía experimentales y por tanto están limitadas a los laboratorios de referencia, las técnicas moleculares basadas en el análisis de la secuencia del ADN constituyen una alternativa muy importante para realizar la identificación de los hongos. El aspecto más interesante de estas técnicas reside en su gran especificidad, que permite, por una parte, la diferenciación de hongos muy similares y, por otra, la identificación de hongos infrecuentes o que no produzcan las estructuras morfológicas utilizadas habitualmente en la clasificación [22-24].

El estudio de las biopsias tisulares es una técnica alternativa muy empleada para el diagnóstico de las micosis invasoras. La observación del hongo en secciones de la muestra utilizando tinciones como la de Plata-Metaminina y PAS se considera una prueba definitiva de la invasión tisular pero no siempre es posible su obtención, y como en el caso de las técnicas microscópicas que se realizan en tiempo real, en la mayor parte de los casos no será posible la identificación a nivel de especie del agente observado. Sin embargo, esta identificación puede realizarse en los hongos que causan las micosis más frecuentes utilizando anticuerpos y sondas de ADN [25,26].

Para el estudio de la sensibilidad de los aislamientos a los antifúngicos se dispone de dos sistemas de referencia para la realización de las pruebas [27,28] y de

varios métodos comercializados que presentan una buena concordancia con los sistemas de referencia. En la mayoría de los casos, estos métodos permiten conocer la sensibilidad a los antifúngicos más utilizados en 24-48h [29].

Los métodos de diferenciación intraespecífica se utilizan generalmente en estudios retrospectivos y pueden ser fenotípicos y genotípicos. Aunque actualmente hay una tendencia a utilizar métodos genotípicos, la realización de estos métodos es generalmente más complicada que la de los fenotípicos, y por tanto, su utilización está restringida a laboratorios de referencia [30].

Retos futuros del diagnóstico micológico

El principal reto del diagnóstico micológico en el futuro continuará siendo la identificación rápida y eficiente de un número cada vez mayor de hongos patógenos para el ser humano. Dado que el esquema diagnóstico actual basado en actuaciones consecutivas puede estar cercano al límite máximo de su rapidez, parece probable que en el futuro se utilicen estrategias diferentes que permitan solucionar las limitaciones actuales. Una de estas estrategias, que ya se está estudiando en diferentes campos de la Medicina, es la utilización de biochips. Los biochips se basan en la hibridación de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en la muestra clínica con varios miles de oligonucleótidos que se encuentran fijados en un soporte de vidrio. Entre los oligonucleótidos del biochip pueden encontrarse secuencias específicas para la identificación de los hongos patógenos y para la detección de mutaciones que confieran resistencias a los antifúngicos o de factores de virulencia, por lo que se podrían realizar todas las detecciones simultáneamente, simplificándose enormemente el diagnóstico [31]. De manera similar, podrían utilizarse biochips para analizar la respuesta del hospedador frente a los hongos e identificar la expresión génica de respuestas específicas que se inducen frente a cada patógeno tras la infección, proporcionando una nueva herramienta para el diagnóstico, pronóstico y manejo de la infección fúngica [32].

Bibliografía

- De Hoog GS, Guarro J, Figueras MJ, Gené J. Atlas of Clinical fungi. 2nd ed. Baarn/Reus, Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2000.
- Carrillo AJ, Guarro J. In vitro activities of four novel triazoles against *Scedosporium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2151-2153.
- Pontón J, García ME, López Medrano R. Diagnóstico basado en métodos independientes del cultivo. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2001; 14.1-14.21.
- Quindós G, Alonso Vargas R, Ruesga Alonso MT, Carrillo-Muñoz AJ. Procesamiento de las muestras de la cavidad oral y otorrinolaringológicas. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2001; 8.1-8.9.
- García Ruíz JC, Hernández I, Muñoz F, Alvarez Blanco A, Pontón J. Cholangitis due to *Aspergillus fumigatus* in a patient with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 228-229.
- Pontón J, Moragues MD, Quindós G. Non-culture based diagnostics. In: Calderone R (Ed.) *Candida* and Candidiasis. Washington, American Society for Microbiology, 2002: 395-425.
- Pontón J, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Alvarez M, Moragues MD. Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med Mycol* 2001; 39 (Suppl. 1): S101-S110.
- Sendid, B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1510-1517.
- Elias Costa MR, Da Silva Lacaz C, Kawasaki M, Camargo ZP. Conventional versus molecular diagnostic tests. *Med Mycol* 2000; 38 (Suppl. 1): S139-S145.
- García-Ruiz JC, Arilla MC, Regúlez P, Quindós G, Alvarez A, Pontón J. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3284-3287.
- Iruretagoyena JR, Regúlez P, Quindós G, Pontón J. Antibodies to *Candida albicans* germ tubes in two intensive care patients with invasive candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 93-96.
- Ibañez-Nolla J, Torres-Rodríguez JM, Nolla M, et al. The utility of serology in diagnosing candidosis in non-neutropenic critically ill patients. *Mycoses* 2001; 44: 47-53.
- Linares MJ, Javier MR, Villanueva JL, et al. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes in heroin addicts with systemic candidiasis. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 224-226.
- Maertens J, Verhaegen J, Demuynck H, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3223-3228.
- Verweij PE, Brinkman K, Kremer HPH, Kullberg B, Meis JFGM. *Aspergillus* meningitis: diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1186-1189.
- Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1169-1175.
- Alonso-Vargas R, Iglesias JJ, Ruesga MT, et al. Utility of a DNA hybridisation test (AFFIRM VPIII) for the rapid diagnosis of *Candida* vaginitis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: S136.
- Morris AJ, Byrne TC, Madden JF, Reller LB. Duration of incubation of fungal cultures. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1583-1585.
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 454-500.
- Linares Sicilia MJ, Solís Cuesta F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2001; 11.1-11.18.
- San Millán R, Ribacoba L, Pontón J, Quindós G. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 153-158.
- Stockman L, Clarck KA, Hunt JM, Roberts GD. Evaluation of commercially available acridinium ester-labelled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 845-850.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1216-1223.
- Kempf VAJ, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 830-838.
- Rüchel R, Behe M, Torp B, Laatsch H. Usefulness of optical brighteners in medical mycology. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 147-149.
- Hayden RT, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV. *In situ* hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 15-23.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Villanova, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming fungi. Proposed standard M38-P. Villanova, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998.
- Martín-Mazuelos E, Cantón Lacasa E, Espinel-Ingroff A. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2001; 16.1-16.9.
- Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 332-370.
- Fodor SPA, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 1993; 364: 555-556.
- Cummings CA, Relman DA. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 513-525.