

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

Desarrollo y validación de técnicas de diagnóstico de infección fúngica invasora

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Sara Gago Prieto

Directoras

María José Buitrago Serna
Isabel Cuesta de la Plaza

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y Validación de Técnicas de
Diagnóstico de Infección Fúngica Invasora**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

SARA GAGO PRIETO

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología,
Instituto de Salud Carlos III

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y Validación de Técnicas de
Diagnóstico de Infección Fúngica Invasora**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

SARA GAGO PRIETO

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología,
Instituto de Salud Carlos III

Madrid, 2014

Directoras:

Dra. María José Buitrago Serna
Científico titular del Centro
Nacional de Microbiología

Dra. Isabel Cuesta de la Plaza
Científico titular del Centro
Nacional de Microbiología

A mis padres y a mi tío Andrés

AGRADECIMIENTOS

Nunca imaginé que me iba a costar tanto trabajo agradecer a las personas que me han ayudado y apoyado durante estos años, los cuales han pasado realmente rápido.

En primer lugar, y saltándome el protocolo por completo, me gustaría agradecer su cariño, amor y paciencia a mis padres y abuelos. Gracias por soportar mi mal humor, por renunciar a regañadientes a mi compañía, por quererme y hacerme cada día mejor persona. ¡Os quiero!

También me gustaría agradecer a mis directoras de tesis MJ e Isabel el haber confiado en mí para la realización de este proyecto. Gracias por vuestros consejos, confianza y ayuda en especial en estos últimos meses. Ya está, ¡se acabó!

A Manolo y Juan Luis porque a pesar de no estar donde estaban siempre han estado disponibles para aconsejarme y ayudarme. Mil gracias.

A “mamá Pepa” por escucharme, por las risas de los lunes por la mañana y por sacarme una sonrisa todos los días. También me gustaría agradecer enormemente el ánimo y la ayuda incondicional recibida en estos años a Alicia, Araceli, Óscar, Laura y Leticia. Sin olvidarme de Emi, gracias por tus consejos tanto científicos como personales en estos años. A todos, gracias por vuestro cariño.

Gracias a las “chicas del labo”, a Carballo, Susana, Ana B., María José Casas, Olga, Gema y en especial a Charo por su ayuda y hacer que todo fuera mucho más sencillo. Gracias por hacerme reír. También a las “chicas del despacho” a Nuria, Cristina Rueda, Ana C, Lili y Agus por hacer cada día más fácil. También a los que ya no están, a Luis y a Emilio intentar poner un poco de paz en este caos.

Me gustaría agradecer de corazón el cariño recibido a Rocío, Anita, Tere, Clara y Cris Armentia que ya son parte de mi familia y a las que adoro. Quisiera agradecer en especial a Ro, mi hermana, por quererme, cuidarme y protegerme durante estos años ya que sin ella nada de esto hubiera sido posible.

I would like to say thank you to Dr. Stevens and his lab members, especially to Marife. Thanks to Karl and Lynda, my American family, I will never forget you! Love you!

También me gustaría echar la mirada hacia atrás y ver donde empezó todo. Quisiera agradecer a todos los miembros del Departamento de Microbiología III de la Facultad de Biología su apoyo y confianza incondicional no solo durante mis años allí, sino por preocuparse de mi evolución. En especial a Blanca, Merche, Susana y Lucía por haberme inculcado el amor incondicional a la microbiología y transmitirme serenidad. Gracias a Paco, Pili, Ruth, Silvia y Raquel por permanecer en mi vida.

Finalmente, hay muchísima gente que ha estado ayudándome durante estos años. Gracias a mis tías postizas, Loli y Angelines, por quererme como a una hija y preocuparse diariamente de mí. A mi familia de Sanabria, no sólo la de sangre sino a los que cada día están ahí para escucharme o sacarme una sonrisa. Gracias a Mónica, Natalia y mi "tito Vicen" por acogerme cada vez que aparezco por sorpresa. A Ruth, Sara y Coli por las tardes en el lago, los cotilleos y las risas. En especial quería agradecer su ayuda, paciencia y cariño a Ángel, Laura y Biz, ¡os quiero!

Como no agradecer el amor recibido a mis mejores amigos, gracias a Nacho y Rochy no sólo por estos últimos años sino por los 25 años que llevamos juntos. Sin vosotros mi vida no sería igual. Gracias a Kenneth, Laura y Marga por estar ahí, por sacarme una sonrisa en el momento que lo necesito y por mimarme. No me puedo olvidar de mi otra hermana postiza, Irene, gracias por aportar un poco de locura a mi vida, ¡te quiero rubia!

Quisiera agradecer la fuerza que me aporta cada día mi tío Andrés, estoy segura de que estarías orgulloso de mí. ¡Te querré siempre!

Finalmente, gracias a todas las personas que no he conseguido recoger en estas líneas pero que a lo largo de estos años me han sacado una sonrisa en algún momento.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	1 -
OTROS ACRÓNIMOS INCLUIDOS EN LAS PUBLICACIONES	3 -
RESUMEN	5 -
ABSTRACT	7 -
1. INTRODUCCIÓN	15 -
1.1. Epidemiología de la infección fúngica	19 -
1.1.1. Candidosis	20 -
1.1.2. Criptococosis	22 -
1.1.3. Histoplasmosis.....	23 -
1.1.4. Coccidioidomicosis.....	24 -
1.1.5. Neumocistosis	25 -
1.2. Situación actual del diagnóstico de la infección fúngica invasora.....	26 -
1.2.1. Métodos convencionales y sus limitaciones	26 -
1.2.2. Detección de biomarcadores.....	28 -
1.2.2.1. Detección de 1,3 β -D-Glucano en sospecha de infección fúngica	28 -
1.2.2.2. Detección de Galactomanano en sospecha de aspergilosis	29 -
1.2.2.3. Detección de antígeno manano-anticuerpo antimanano en candidosis	30 -
1.2.2.4. Determinación de antígeno de <i>Cryptococcus</i>	30 -
1.2.2.5. Detección de la interacción antígeno-anticuerpos en micosis endémicas	31 -
1.2.3. PCR en tiempo real para el diagnóstico de infección fúngica invasora	33 -
1.3. Métodos moleculares de identificación de hongos patógenos humanos: métodos clásicos y nuevas técnicas basadas en análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM)	38 -
2. OBJETIVOS.....	43 -

3.	OBJETIVO PRIMERO:	- 47 -
3.1.	Diagnóstico e identificación de hongos que causan infección oportunista en pacientes infectados con VIH (<i>Pneumocystis jirovecii</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> y <i>Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii</i>) mediante PCR en tiempo real	- 49 -
3.2.	Desarrollo de una PCR cuantitativa en tiempo real para el diagnóstico de coccidioidomicosis.....	- 61 -
4.	OBJETIVO SEGUNDO:	- 71 -
4.1.	Identificación de las especies del <i>complejo Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> mediante HRM.	- 73 -
4.2.	Identificación molecular de especies del complejo <i>psilosis</i> mediante análisis de HRM basado en la región intergénica del DNA ribosómico IGS-1.	- 79 -
4.3.	Tipado molecular en <i>Candida albicans</i> mediante análisis HRM	- 93 -
5.	DISCUSIÓN	- 105 -
5.1.	Detección de los hongos patógenos humanos que causan neumonía en el paciente inmunodeprimido mediante PCR en tiempo real en un solo tubo.....	- 107 -
5.2.	Diagnóstico de coccidioidomicosis en área endémica.....	- 113 -
5.3.	Identificación al nivel de especie y subespecie de levaduras patógenas mediante HRM	- 117 -
5.3.1.	HRM aplicado a la identificación de complejos de especies	- 118 -
5.3.1.1.	Identificación de los complejos de especies <i>Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii</i>	- 118 -
5.3.1.2.	Identificación del complejo de especies <i>Candida parapsilosis</i>	- 119 -
5.3.2.	HRM aplicado a la tipificación molecular: estudio de una infección recurrente	- 121 -
5.4.	Aplicación de los Resultados: Perspectivas	- 124 -
6.	CONCLUSIONES	- 127 -
7.	REFERENCIAS	- 131 -

8. ANEXOS..... - 155 -

ANEXO 1: - 157 -

ANEXO 2: - 161 -

ANEXO 3: - 167 -

ANEXO 4: - 171 -

ANEXO 5: - 175 -



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

AI: Aspergilosis invasora

ATCC: Colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection)

CBS: Centro de biodiversidad de hongos (Centraalbureau voor Schimmelcultures)

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CI: Candidosis invasora

CL: Colección de Levaduras

CM: Colección de hongos Miceliales

CNM: Centro Nacional de Microbiología

DHFR: Dihidrofolato Reductasa

E: Especificidad

EAPCRI: Iniciativa europea para la estandarización de la PCR de *Aspergillus* (European Aspergillus Polymerase Chain Reaction Initiative)

EBI: Instituto europeo de bioinformática (European Bioinformatic Institute)

EF-1 α : Factor de elongación 1 α (Elongation Factor 1 α)

EIA: Electroinmunoensayo (Electroimmunoassay)

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent assay)

ENA: Archivo europeo de nucleótidos (European Nucleotide Archive)

EORTC: Organización Europea para la Investigación y tratamiento del cáncer (European Organization for Research and Treatment of Cancer)

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstruiva Crónica

FDA: Agencia de alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration)

HRM: Curvas de fusión de alta resolución (High Resolution Melting)

IDSA: Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (Infectious Diseases American Society)

IgG: Inmunoglobulina G

Acrónimos

IgM: Inmunoglobulina M

IGS: Espaciador intergénico (*Intergenic Spacer*)

ITS: Espaciador transcrito interno (*Internal Transcribed Spacer*)

LBA: Lavado broncoalveolar

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LFA: Ensayo de flujo lateral (*Lateral Flow Assay*)

MLST: Tipado multilocus de secuencias (*Multilocus Sequence Typing*)

MSG: Grupo de Estudio de Micosis (*Mycoses Study Group*)

mtADN: ADN mitocondrial

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PJP: Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (*Pneumocystis jirovecii pneumonia*)

rADN: ADN ribosómico

S: Sensibilidad

SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

OTROS ACRÓNIMOS INCLUIDOS EN LAS PUBLICACIONES

5FC: 5 Fluorocytosine

AB: Amphoreticin B

AFLP: Amplified Eragment Length Polymorphism

AIDS: Acquired Immunodeficiency sndrome

AN: Anidulafungin

BAL: Bronchoalveolar Lavage

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

bp: base pairs

CA: Caspofungin

CE: Conidial Equivalent

CFU: Colony Forming Units

CIMR: California Institute for Medical Research

CM = Coccidioidal Meningitis

Cp: Crossing point

Cq: Cycle of quantification

CSF: Cerebrospinal Fluid

CV: Coefficient of Variation

CY5: Indodicarbocyanine

D: Diversity Index

DNA: Desoxyribonucleic Acid

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAM: 5-carboxyfluorescein

FI = other Fungal Infection

FZ: Fluconazole

gDNA: genomic DN

HEX: 6-carboxy-2 ,4,4 ,5 ,7,7 -hexachlorofluorescein succinimidyl ester

Acrónimos

HIV: Human Immunodeficiency Virus

IFA: Immunofluorescence Assay

IZ: Itraconazole

LSU: Large Subunit

MC: Micafungin

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

MLP: Microsatellite Length Polymorphism

Mrt-PCR: Multiplex Real Time PCR

NED: phenyl-1.4-dichloro-6-carboxyfluorescein

NIH: National Institute for Health

OD: Optical Density

PC = Pulmonary Coccidioidomycosis

PCP: Pneumocystis carinii pneumonia

pDNA: plasmidic DNA

PZ: Posaconazole

qPCR: quantitative PCR

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA: Ribonucleic Acid

ROX: 5-carboxy-X-rhodamine

rs: Spearman coefficient

RT-PCR: Real Time-PCR

SC = Systemic Coccidioidomycosis

SNPs: Single Nucleotide Polymorphism

TNF: Tumor Necrosis Factor

UNAIDS: United Nations Programme on HIV/AIDS

VZ: Voriconazole

WHO: World Health Organization

RESUMEN

La infección fúngica grave causa la muerte a 1,3 millones de personas anualmente. Se ha descrito que el diagnóstico temprano de la infección reduce la mortalidad asociada. Sin embargo, muchas de las técnicas actuales no permiten una respuesta rápida y varían en cuanto a sensibilidad y especificidad. Por ello, se necesitan nuevas aproximaciones que den respuesta en tiempos más cortos, y que permitan realizar un diagnóstico diferencial cuando varios microorganismos causan el mismo cuadro clínico. En esta tesis se han desarrollado herramientas basadas en PCR en Tiempo Real (RT-PCR), fácilmente transferibles al Sistema Nacional de Salud para el diagnóstico e identificación de especies de hongos de gran importancia médica.

En el primer objetivo, se han desarrollado herramientas de diagnóstico rápido basadas en RT-PCR para el diagnóstico diferencial de hongos que causan neumonía oportunista en pacientes con SIDA (neumocistosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis) y para el diagnóstico de coccidioidomicosis. Se desarrollaron dos ensayos, uno de ellos en formato múltiple para la detección simultánea de *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* y *Cryptococcus neoformans*, y el otro para la detección de ADN de *Coccidioides* spp. Los cebadores y sondas *molecular beacon* específicas para cada una de las especies se diseñaron en la región ITS del ADN ribosómico. Ambas técnicas presentaron valores de sensibilidad y especificidad *in vitro* del 100% y coeficientes de variación del 3%. La validación en muestras clínicas de pacientes con infección probada presentó valores de sensibilidad y especificidad del 90% y 100% en ambas técnicas. En el caso de la coccidioidomicosis, se comparó la utilidad de la RT-PCR con el cultivo microbiológico en un modelo murino de infección. Así, se determinó la carga fúngica en hígado, bazo y pulmón durante 14 días de infección. Las técnicas mostraron una concordancia muy buena ($\kappa > 0.95$) y evaluaron la progresión de la infección en el mismo sentido ($p > 0.05$), aunque la PCR cuantitativa detectó una carga fúngica entre 10-1000 veces mayor que el cultivo microbiológico.

Resumen

En el segundo objetivo de la tesis, se ha evaluado la utilidad de la RT-PCR y el análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM) para la identificación de hongos patógenos humanos. Las herramientas de identificación molecular han ayudado a descubrir que muchas especies clasificadas por los métodos morfológicos como una sola, son en realidad un complejo de especies. Además, algunas de estas especies presentan diferencias en cuanto a epidemiología, virulencia o sensibilidad a los antifúngicos. Por ello, se han desarrollado dos métodos de HRM para la identificación de especies del género *Cryptococcus* y el complejo *Candida parapsilosis*. Los procedimientos desarrollados permitieron la amplificación específica de regiones del DNA ribosómico, 100 pb de la región ITS de *Cryptococcus* y 70 pb de la región IGS-1 del complejo *C. parapsilosis*. La concordancia entre HRM y la identificación mediante secuenciación de las mismas dianas fue del 100%. Este método es sencillo, rápido y no requiere de una base de secuencias curada para su aplicación, lo que facilita su transferencia a laboratorios clínicos.

Finalmente, y dentro de este segundo objetivo, se analizaron regiones de microsatélites en tres genes (CDC3, HIS3 y EF3) de varias cepas de *Candida albicans* responsables de infección recurrente mediante HRM y electroforesis capilar. Ambas técnicas demostraron que las cepas responsables de los episodios de infección tenían un origen clonal a pesar de presentar diferencias en su susceptibilidad a los azoles. Aunque el poder de discriminación mediante HRM (0.77) fue menor que mediante electroforesis capilar (0.92), el HRM permite realizar un cribado de las cepas relacionadas de forma rápida y económica. Además, esta metodología permitiría el estudio de brotes y evita el uso de métodos de tipado más complejos de difícil implantación en laboratorios asistenciales.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Invasive fungal infections are globally a major cause of mortality, with more people dying from the 10 main invasive fungal diseases than from tuberculosis or malaria. The development of new antifungal drugs and medical procedures has not led to a decrease in the mortality rates and often infection continues to be diagnosed only after it is disseminated.

Laboratory diagnosis of invasive fungal infections is based on classic microbiological methods. Although culture is the gold standard to define proven invasive infection, this method is slow and has low sensitivity and specificity. Histopathology may be useful, but it is not often specific and fungal structures can only be detected when the infection is widespread. In recent years, newer diagnostics tools based on the detection of fungal cell wall components have been developed for earlier diagnosis of invasive fungal infections than that afforded by more traditional methods. Some of these tools allow for the detection of a wide range of fungal pathogens (e.g., 1,3-b-D glucan), while others are more specific such as galactomannan detection for invasive aspergillosis or the detection of the capsular antigen of *Cryptococcus*. Serologic tests have also been developed mainly for the diagnosis of endemic mycoses, but these can be falsely negative early after the initial infection. Thus, the development of new tools for early diagnosis is needed.

Molecular methods for the diagnosis of fungal infections may be useful, but validation of the assays is pending. Real Time polymerase chain reaction (RT-PCR) protocols are useful tools for the diagnosis of fungal infections as they allow the detection of small amounts of DNA in clinical samples. Conventional PCR and RT-PCR approaches have been described for the diagnosis of a wide range of fungal pathogens (e.g., *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, or Mucorales); however, their sensitivity and specificity in clinical samples have varied. Moreover, some RT-PCR approaches for the diagnosis of invasive aspergillosis or pneumocystosis have been commercialized but their sensitivity and specificity depend on the underlying

Abstract

conditions of the patients and the clinical sample. Although these tools may contribute to improved diagnosis, new approaches for other groups at risk of fungal infection are needed. For these new tools it will be important for them to distinguish among pathogens that cause non-specific symptomatology. This is the case of HIV/AIDS patients for which pneumonia can be associated with *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum* or *P. jirovecii*. The development of a single step diagnostic tool to distinguish among these three pathogens might be useful to determine the most effective antifungal therapy and thus decrease the high rates of associated mortality. Moreover, endemic mycoses have increased in non-endemic areas due to travel and emigration. The development of diagnostic tools for these infections in non-endemic area is important because of the lack of clinical awareness and suspicion during diagnosis, and also because the risk of infection to laboratory personnel that is associated with handling these microorganisms is high.

Fungal identification by molecular methods involves the sequencing of specific DNA targets, mainly the ITS region of the ribosomal DNA. This specialized approach is time consuming and requires an appropriate database for sequence comparison. Consequently, institutions have to send samples to a reference laboratory, which increases turnaround time for identification and removes the potential benefits of early diagnosis. Interestingly, molecular identification has shown that morphological species may encompass two or more phylogenetic species. The discovery of a cryptic species or close-related species is medically relevant because different species can differ in virulence or antifungal drug resistance. Additionally, the correct characterization of strains involved in recurrent infection or outbreaks is very important for patient management; these characterizations are performed in reference laboratories using molecular tools, such as multilocus sequence typing or microsatellite length polymorphisms, which are not user-friendly. Thus, the development of easier and faster molecular tools based on RT-PCR and high resolution melting analysis that can be applied routinely in the clinical setting may be useful.

OBJECTIVES

The main objective of this thesis was to develop new and easily performed molecular tools based on RT-PCR to be used for the early diagnosis and identification of invasive fungal infections. We have described the utility of using a RT-PCR assay based on, *molecular beacon* probes and high resolution melting curve analysis (HRM). For this purpose, we have focused on some of the most relevant problems in medical mycology. Particularly, we have addressed the following specific objectives.

1. Development of a Real Time Based assay to diagnose fungal pathogens that cause fungal infection in HIV/AIDS patients (*Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis jirovecii*, and *Cryptococcus neoformans*) and for diagnosis of coccidioidomycosis in patients in non-endemic areas.
2. To identify closely related species that are epidemiology relevant: *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* and *Candida parapsilosis* complex.
3. To study the strain-relatedness among strains of *Candida albicans* involved in recurrent infections.

RESULTS

A. Early diagnosis of fungal pathogens involved in coccidioidomycosis and opportunistic pneumonia in immunocompromised patients by RT-PCR.

Two RT-PCR assays, based on *molecular beacon* probes, for the simultaneous detection of *P. jirovecii*, *H. capsulatum*, and *C. neoformans*, as well as another single assay for detection of *Coccidioides* spp. were developed. Species-specific primers and probes were targeted to the ITS region of the rDNA. An internal control was included in each reaction to avoid falsely negative results. These assays showed a high analytic reproducibility, sensitivity (100%), specificity (100%), with a coefficient of variation close to 3% on cultured strains. Validation of both techniques was performed using clinical samples from patients with proven infection, non-related fungal infection and patients with other underlying conditions. A total of 69 patients were evaluated in the multiplex assay and 17 patients were evaluated in the assay for coccidioidomycosis. The sensitivity of both assays using clinical samples was higher than 90% and the specificity was 100%. False negative results were related to viability lost due to long-

Abstract

term storage of specimens, and no specimen-related PCR inhibition was detected. Moreover, for one of the patients included in the validation assay, mixed infection due to *H. capsulatum* and *P. jirovecii* was detected.

Due to the lack of concurrent validation by RT-PCR and standard diagnostic techniques in a prospective trial for coccidioidomycosis, a murine model of disseminated of infection was established. Fungal burdens in the organs of mice infected with *Coccidioides posadasii* strain Silveira were more accurately quantified by RT-PCR compared to colony-forming unit for all tissues. The RT-PCR assay was positive for 97.7% of spleen and 100% of liver or lung. Progression of infection in all organs was similar by both methods ($P > 0.05$). Moreover, the sensitivity of the assay was 100% for paraffin-embedded samples.

B. Accurate identification and characterization of close related fungal species and strains involved in recurrent infections by RT-PCR and HRM analysis.

Three RT-PCR assays based on HRM analysis were developed to distinguish among closely related species and strains from medically relevant fungal species.

For this propose, two HRM assays were developed, one to distinguish among *Cryptococcus neoformans complex-Cryptococcus gattii* groups and another one for the *C. parapsilosis* species complex. First, we designed a two-step method based on HRM that identifies species within the *Cryptococcus* species complex. A region of 100 bp within the ITS region of the rDNA was amplified for this propose. In the first analysis we could discriminate between *C. gattii* and *C. neoformans* (*var. neoformans* and *var. grubii*). However, analysis conditions were changed to differentiate within *C. neoformans* complex. AD hybrids and D strains could not be discerned using this analysis, which is in agreement with the fact that the DNA sequences of the amplified region are identical in these strains.

To distinguish among *C. parapsilosis* species complex we analyzed the sequence of the IGS1 and the ITS regions of the rDNA from 33 *C. parapsilosis sensu lato* strains. Although both regions are useful in identifying species, comparative sequence analysis showed that the diversity in the IGS1 region was higher than that in the ITS sequence. Therefore, we developed an HRM assay based on the amplification of 70 bp in the IGS1 region. All isolates were correctly identified with a confidence interval >98%.

Finally, nine strains of *C. albicans* involved in a case of recurrent were analyzed using, Microsatellite Length Polymorphism (MLP) with three microsatellite markers (HIS 3, EF 3 and CDC 3), and were also analyzed by a new method based on HRM. MICs of the isolates showed the existence of fluconazole susceptible and resistant strains. An inter-colony test using single concentration (8 and 16 mg/l) of fluconazole revealed the coexistence of both fluconazole susceptible and resistant strains. Both genotyping analysis methods showed that all of the nine patient isolates had a clonal origin. The HRM analysis method developed was able to accurately establish strain relatedness and with a discriminatory power of 0.77.

DISCUSSION

1. Diagnosis of opportunistic fungal pneumonia and coccidioidomycosis by Real Time PCR

For the first time, we have developed two internally-controlled Real-Time PCR assays based on specific-molecular beacon probes one for the simultaneous detection of three fungal species involved in opportunistic pneumonia and one for coccidioidomycosis. Our approaches may have clinical application, as sensitivity and specificity were higher than 90% on both, cultured strains and clinical samples.

H. capsulatum, *P. jirovecii*, and *C. neoformans* are the primary causes of opportunistic pneumonia in AIDS patients. Due to the lack of specific symptoms and because tuberculosis symptoms are very similar to those caused by these fungal pneumonias, a differential diagnosis is required. Conventional diagnosis is based on culture, serology, and detection of antigens. However, the sensitivity and specificity values vary among the different approaches and the clinical specimen used (30-90%).

In addition, the approach of a multiplex RT-PCR could be very useful to detect mixed infections that appear in patients with advanced immunosuppression living in areas of endemicity. Therefore, this assay would be useful for the clinical management of other immunocompromised patients at risk for these fungal infections (e.g., patients under corticosteroid therapy or chemotherapy or those treated with anti-tumor necrosis factor). Furthermore, our single-plex RT-PCR assay was effective for the diagnosis and monitoring of infection due to *Coccidioides*; its use also avoids the biohazard and time delay of identifying cultures in the clinical laboratory setting.

Abstract

Although RT-PCR assays are more expensive than conventional approaches, they provide a faster, more accurate diagnosis, and they avoid delays in the initiation of appropriate antifungal therapy. In addition, these assays could be implemented in clinical laboratory settings in developing countries and in countries that receive immigrant populations from those regions where the diseases are more prevalent.

2. RT-PCR based on HRM analysis is useful for fungal species identification and strain genotyping.

Fungal species identification is time consuming, delaying the benefits of early diagnosis. The recent development of HRM analysis using fluorescent DNA binding dyes with improved saturation properties allows a precise assessment of sequence variation based on the analysis of DNA melting curves. Our results suggest that RT-PCR protocols based on HRM analysis targeted to amplify a short region of the rDNA are useful for fungal identification of closely related species that cannot be distinguished by morphological examination. This is important for differentiation between *C. neoformans-C. gattii* species, which show differences in virulence and epidemiology; and the *C. parapsilosis* species-complex, which have shown differences in virulence and antifungal susceptibility. To this end, we have shown that differences in the ITS region of the rDNA of the *C. parapsilosis* complex are not sufficient to differentiate among cryptic species, and found that another region, the IGS region, is more suitable. We have also demonstrated the utility of a HRM-based approach for microsatellite length genotyping of strains of *C. albicans* involved in a case of recurrent candiduria. Recurrent infections and outbreaks due to *C. albicans* strains are important in the clinical setting, and establish the strain relatedness is not easy to perform and is also time consuming. Our results prove that only one clinical strain may be involved in each of the episodes of infection, although the various strains show different susceptibility to antifungals.

The development of molecular approaches for fungal species identification, with clinical application, is important because it avoids delays in the clinical responses that occur when institutions send samples to reference laboratories. However, our results have shown some limitations, such as *Cryptococcus* AD hybrids cannot be distinguished by our methods, and the discriminatory power of the microsatellite analysis was not as

high as what can be obtained using capillary electrophoresis. Regardless, these methods provided an easier, more rapid, and more cost-effective tool for genotyping and fungal species identification.

To summarize, molecular approaches based on RT-PCR can be useful for the diagnosis and identification of fungal infection. The use of this technology in the clinical setting may contribute to initiation of early therapy and improved outcome.

1. INTRODUCCIÓN

La infección fúngica comprende un amplio espectro de enfermedades causadas hasta por 600 especies de hongos (García-Solache y Casadevall, 2010). Afectan a cualquier parte del cuerpo, desde la piel hasta el cerebro, el hígado o el pulmón. Unas son agudas y muy graves, como la meningitis criptocócica o la queratitis (infección traumática del ojo); otras recurrentes, como la vaginitis o la candidosis oral y otras crónicas, como la aspergilosis pulmonar crónica o la tiña pedis (Brown et al., 2012). Además, existen infecciones fúngicas delimitadas a una zona geográfica, lo que se conoce como micosis endémicas, y otras que son extremadamente infrecuentes y por tanto difíciles de estimar (Colombo et al., 2011).

Durante los últimos 15 años se han conseguido avances significativos en el diagnóstico y tratamiento de algunas de estas infecciones, pero no en todas (Ostrosky-Zeichner, 2012). Se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico basados en biomarcadores, como la detección del antígeno polisacárido capsular, de 1,3-β-D glucano, de galactomanano y de manano. Todos ellos presentan ventajas e inconvenientes, ya que algunos solo indican la presencia de infección fúngica pero no la especie que la causa (1,3-β-D glucano), y otros únicamente son útiles para detectar un grupo reducido de patógenos como *Aspergillus* (galactomanano), *Candida* (manano) y *Cryptococcus* (antígeno polisacárido) (Cuenca-Estrella et al., 2011; Cuenca-Estrella et al., 2008). Simultáneamente, se han desarrollado técnicas moleculares, basadas principalmente en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Algunas de estas técnicas se han comercializado, como el Septi Fast (Roche Diagnostics) que detecta cinco especies de *Candida* y *Aspergillus fumigatus* en sangre o el MycAssay (Myconostica) para el diagnóstico, en dos ensayos diferentes, de la aspergilosis invasora en el paciente hematológico (Buchheidt y Hummel, 2005) y la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (Hauser et al., 2011).

Estos avances han resuelto de forma parcial el problema del diagnóstico de la infección fúngica. Sin embargo, se necesitan nuevas aproximaciones como por ejemplo, técnicas que permitan realizar un diagnóstico diferencial cuando varios microorganismos son los causantes del mismo cuadro clínico. Un claro ejemplo en el campo de la micología médica es la neumonía del paciente con SIDA. Cualquiera de estos patógenos, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *P. jirovecii*,

Introducción

pueden causar neumonía por lo que sería de gran utilidad la existencia de técnicas de diagnóstico rápido y exacto que confirmaran, en un solo paso, la etiología de la misma (Huang y Crothers, 2009).

Además, es necesario abordar el diagnóstico de infecciones asociadas a la población inmigrante, especialmente cuando dicha enfermedad es infrecuente en el hábitat receptor. Esta situación se ha producido en España debido a un aumento significativo de la inmigración proveniente de países con micosis endémicas que no existen en nuestro entorno (Buitrago y Cuenca-Estrella, 2012). La ausencia de metodología diagnóstica fiable en Europa, la peligrosidad en el manejo de estos patógenos de nivel de contención 3 y la lentitud de las técnicas clásicas, basadas en la observación microscópica y el cultivo de muestras obtenidas del paciente (Hsu et al., 2011), ha obligado al desarrollo de técnicas sensibles, específicas y sencillas que permitan un diagnóstico fiable de estas micosis endémicas.

Otra de las funciones de los laboratorios de referencia es simplificar las metodologías complejas y de difícil realización fuera de ese ambiente súper especializado, para que se puedan realizar en entornos menos complejos. Durante estos últimos años, las herramientas de identificación molecular han ayudado a descubrir que muchas especies clasificadas por los métodos tradicionales morfológicos como una sola, albergan otras indistinguibles denominadas especies crípticas (Taylor et al., 2000). En muchas ocasiones, la caracterización de estas especies crípticas tiene importancia clínica, ya que, por ejemplo, su perfil de resistencia a los antifúngicos es diferente, y por tanto su identificación exacta ayuda a la elección del tratamiento más adecuado (Alastruey-Izquierdo et al., 2013). Además, en algunas infecciones se ha detectado la coexistencia de cepas sensibles y resistentes. Debido a la naturaleza de los ensayos clásicos de sensibilidad se puede llegar a la conclusión errónea de que la cepa es sensible cuando en realidad hay clones resistentes dentro de la población, lo que conlleva un tratamiento equivocado y una mala evolución del paciente (Odds et al., 2006; Vanhee et al., 2010).

En el entorno económico actual, con la necesidad de mantener la calidad de la asistencia médica al más alto nivel pero a un coste contenido, es necesario e

importante el desarrollo de técnicas simples que puedan ser transferibles y que conlleven una información beneficiosa para la evolución del paciente. En resumen, en este trabajo de tesis se abordan problemas actuales en micología médica como son: (i) el diagnóstico diferencial mediante PCR en tiempo real de hongos causantes de neumonía oportunista en pacientes con SIDA; (ii) el diagnóstico de la coccidioidomycosis mediante PCR en tiempo real y (iii) la identificación de especies crípticas y clones con diferente perfil de sensibilidad a los antifúngicos mediante PCR en tiempo real y análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM).

En los siguientes apartados de la introducción se van a describir, de forma resumida, la situación actual de la epidemiología y el diagnóstico de las infecciones fúngicas justificando la priorización de los patógenos incluidos en este trabajo de tesis.

1.1. Epidemiología de la infección fúngica

En la actualidad, se estima que más de 300 millones de personas sufren una infección fúngica grave, que 25 millones son susceptibles de padecerla (Brown et al., 2012), y que fallecen más de 1,3 millones de personas anualmente por una infección de este tipo (<http://www.gaffi.org>).

Las infecciones más frecuentes afectan a la piel y a las mucosas (Brown et al., 2012). La incidencia de las mismas varía en función de las condiciones socioeconómicas, la geografía o los hábitos culturales, pero se ha estimado que aproximadamente el 25% de la población mundial presenta una infección fúngica cutánea fácil de tratar con los antifúngicos disponibles (Havlickova et al., 2008). La candidosis vaginal recurrente afecta a más de 75 millones de mujeres (Aballea et al., 2013). Otras infecciones más graves pero no sistémicas, como la queratitis fúngica, aquejan a más de un millón de personas al año (Lalitha et al., 2014). Asimismo, otros procesos englobados dentro de la enfermedad fúngica alérgica, como la aspergilosis broncopulmonar alérgica y el asma grave con sensibilización fúngica, afectan aproximadamente a 4,8 y 3,5 millones de personas respectivamente (Denning et al., 2013; Knutsen et al., 2012). Por el contrario, la infección fúngica invasora, tiene una incidencia menor pero una mortalidad asociada por encima del 50% a pesar de la

comercialización de nuevos antifúngicos (Cuenca-Estrella et al., 2008; Cuenca-Estrella et al., 2009; Pfaller, 2012; Shao et al., 2007). En consecuencia, la mortalidad anual asociada a las diez principales causas de micosis invasora es equiparable a las que ocasiona la tuberculosis (1,4 millones de muertes anuales) o la malaria (1,2 millones de muertes anuales) (Brown et al., 2012; Cullen et al., 2013; D'Enfert, 2009) (Figura 1).

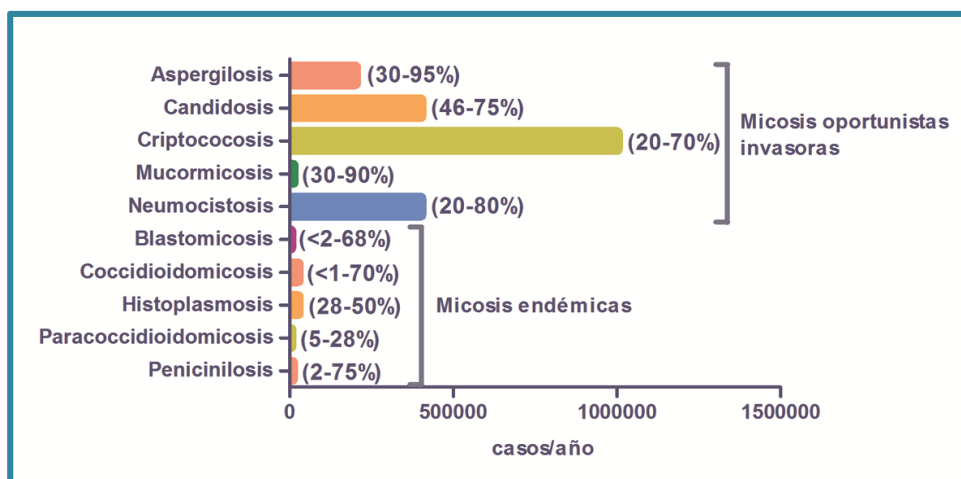


Figura 1: Estimación de los casos de infección fúngica invasora por año. En las micosis endémicas la estimación se refiere al número de infecciones por año en área endémica. El porcentaje de mortalidad asociado se muestra entre paréntesis. Modificada de (Brown et al., 2012).

A continuación, se detallarán algunos aspectos epidemiológicos y clínicos de las infecciones fúngicas objeto de estudio de esta tesis.

1.1.1. Candidosis

Las especies del género *Candida* son el principal agente causal de infección fúngica invasora en pacientes inmunodeprimidos, en aquellos que han sido sometidos a procedimientos diagnósticos o quirúrgicos agresivos, que han sufrido un trauma o un ingreso prolongado en la unidad de cuidados intensivos (Richardson y Lass-Flörl, 2008). La incidencia de candidemia en España se ha duplicado en los últimos ocho años y actualmente es de 8,1 casos por cada 100.000 habitantes (Puig-Asensio et al., 2013). En comparación con Estados Unidos, la incidencia en España es similar a la que se da en ciertos estados de dicho país (6-8 casos por cada 100.000 habitantes) e inferior a otros, donde alcanza los 20 casos por 100.000 habitantes (Pfaller et al., 2012). En Europa también existen diferencias geográficas. Por ejemplo, en Dinamarca la

incidencia es similar a la de España, 8,6 casos/100.000 habitantes, pero en otras regiones del centro y norte de Europa la incidencia oscila entre 3-5 casos por 100.000 habitantes (Arendrup et al., 2011; Poikonen et al., 2010; Poikonen et al., 2003; Sandven et al., 2006).

En relación con las especies causantes, *Candida albicans* es responsable de más de la mitad de los casos de candidosis invasora, pero otras especies como *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* o *Candida guilliermondii* se consideran patógenos emergentes (Diekema et al., 2012; Guinea et al., 2014; Horn et al., 2009; Nucci et al., 2013; Nucci et al., 2010; Pemán et al., 2012; Pfaller et al., 2012; Pfaller y Diekema, 2007; Puig-Asensio et al., 2013). Sin embargo, la incidencia de estas especies emergentes depende de la localización geográfica, la edad (Bouza y Muñoz, 2008), la población de riesgo (Pfaller et al., 2012) y del uso de fluconazol (Malani et al., 2005). Así, mientras *C. parapsilosis* es la segunda causa de candidemia en España y América Latina (Nucci et al., 2013; Puig-Asensio et al., 2013); *C. glabrata* lo es en Estados Unidos (Pfaller et al., 2012) y el este de Europa (Arendrup et al., 2011).

En función de la población de riesgo, *C. albicans* es responsable de hasta el 70% de los episodios de candidemia en pacientes con tumores sólidos pero solo del 36% en los pacientes con enfermedad hematológica (Pfaller et al., 2012). En relación con la edad, *C. parapsilosis* es más frecuente en neonatos y *C. glabrata* en ancianos (Bouza y Muñoz, 2008). Además, se ha producido un aumento de las infecciones mixtas por especies de *Candida* alcanzando el 30% de los casos de candidemia en el paciente infectado por el VIH (Pfaller et al., 2012). Asimismo, la generalización del uso del fluconazol ha producido un desplazamiento de las especies más sensibles por otras más resistentes como *C. krusei* o *C. glabrata* (Procop y Roberts, 2004).

El desarrollo de herramientas de identificación molecular ha introducido el concepto de especies crípticas, definido como aquellos hongos morfológicamente semejantes entre sí pero que a nivel genético constituyen una especie diferente (Taylor et al., 2000). Dentro del género *Candida*, *Candida nivariensis* (Alcoba-Florez et al., 2005) y *Candida bracarensis* (Correia et al., 2006) se han definido como especies

Introducción

críticas de *Candida glabrata*, así como *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* lo son de *C. parapsilosis* (Tavanti et al., 2005). En el complejo *psilosis* (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*) no sólo existen diferencias genéticas entre dichas especies, sino también de virulencia y sensibilidad a los antifúngicos (Gacser et al., 2007; Lockhart et al., 2008a; Orsi et al., 2010; Silva et al., 2009a; Silva et al., 2009b). Se ha señalado que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* son más sensibles a las equinocandinas pero más resistentes a los azoles que *C. parapsilosis* (Silva et al., 2009a). Otros estudios publicados recientemente, sitúan a *C. orthopsilosis* entre la quinta o la octava causa de candidemia en España según los autores (Pemán et al., 2012; Puig-Asensio et al., 2013).

1.1.2. Criptococosis

La criptococosis es una infección fúngica causada por especies del género *Cryptococcus* y asociada principalmente al SIDA (Antinori, 2013). La infección se produce tras la inhalación de las esporas del medio ambiente y, aunque su presentación más frecuente es la meningoencefalitis, también puede causar neumonía, infecciones diseminadas y localizadas (La Hoz y Pappas, 2013). En esta infección están implicadas fundamentalmente variedades del complejo *Cryptococcus neoformans* (var. *neoformans* y var. *grubii*) que afectan a individuos inmunocomprometidos, y también la especie *Cryptococcus gattii* que puede afectar a individuos inmunocompetentes (Kronstad et al., 2011). Se estima que la incidencia global de meningitis criptocócica es de un millón de casos al año, causando la muerte a más de 620.000 individuos en el África Subsahariana (Brown et al., 2012).

Además del SIDA hay otros factores de riesgo, como defectos en la inmunidad celular (neutropenia), linfomas, esplenectomía y tratamiento con corticoides (Li y Mody, 2010; Qazzafi et al., 2007). *C. gattii* tiene una distribución geográfica más limitada a regiones tropicales y subtropicales (Región Central y Sur del Pacífico, América Latina, California) (Chaturvedi y Chaturvedi, 2011). Desde principio de los años noventa, el número de casos de criptococosis por *C. gattii* ha aumentado considerablemente en la isla canadiense de Vancouver y se ha ido extendiendo por los Estados Unidos en la Columbia Británica, Washington y Oregón, alcanzando una

mortalidad del 33% (Dixit et al., 2009). Sin embargo, se desconocen las causas de su propagación y del aumento de la incidencia (Fraser et al., 2005).

1.1.3. Histoplasmosis

La histoplasmosis es una micosis endémica de América, África y algunas regiones de Asia (Kasuga et al., 2003). Se estima que anualmente se producen 300.000 casos con una mortalidad asociada del 3,33% (unos 10.000 casos anuales) (Armstrong-James et al., 2014). El agente causal es *Histoplasma capsulatum* cuyo hábitat principal es el guano de los pájaros (Chin et al., 1970). La infección se produce al inhalar las microconidias de la fase micelial del hongo, las cuales se convierten en levaduras en el pulmón, o bien tras una reactivación en individuos inmunodeprimidos previamente expuestos (Wheat, 1995). Existen varias formas clínicas de la histoplasmosis y su aparición depende del inóculo inhalado, la edad, el estado inmunológico del paciente o la presencia de una enfermedad pulmonar concomitante (Colombo et al., 2011; Queiroz-Telles et al., 2011). La gran mayoría de los individuos que inhalan esporas de *H. capsulatum* no desarrollan sintomatología (>90%), pero existen casos de infecciones agudas sintomáticas que varían desde síndromes respiratorios leves a infecciones pulmonares que ponen en peligro la vida del enfermo. También se han descrito casos de histoplasmosis pulmonar aguda en individuos que han realizado actividades al aire libre consideradas de riesgo como visita a cuevas, excavaciones y actividades de reconstrucción o agrícolas (Kasuga et al., 2003). Por último, en individuos inmunocomprometidos, fundamentalmente infectados por el VIH, se pueden producir infecciones diseminadas (Kauffman, 2007; Wheat et al., 2007). Así, en zonas endémicas, la histoplasmosis es la primera manifestación de SIDA en el 50-70% de los pacientes con VIH (Cano y Hajjeh, 2001). De hecho, más del 90% de los pacientes con VIH que viven en regiones endémicas desarrollan histoplasmosis, siendo diseminada entre el 2-5% de los casos (Cano y Hajjeh, 2001; Wheat, 1994; Wheat, 1995). En pacientes VIH con infección diseminada no sometidos a terapia antirretroviral, la mortalidad asociada es del 40% (Tobon et al., 2005). Sin embargo, desde finales de los años noventa, la prevalencia de infección diseminada ha disminuido en pacientes VIH en tratamiento antirretroviral de alta eficacia (Colombo et al., 2011).

Introducción

En España se ha registrado un aumento de la incidencia de las micosis importadas, principalmente histoplasmosis, debido a la inmigración y a los viajes (Buitrago y Cuenca-Estrella, 2012). Aproximadamente el 38% de la población emigrante que reside en España procede de zonas endémicas y, además, un millón de españoles viaja cada año a estos países. Así en los últimos treinta años se han publicado 128 casos de histoplasmosis en España, de los cuales el 88% se describieron a partir del año 2000 (Buitrago y Cuenca-Estrella, 2012).

1.1.4. Coccidioidomicosis

La coccidioidomicosis es una micosis endémica del sudoeste de Estados Unidos y determinadas regiones de América Latina (Barker et al., 2007). Dicha micosis está causada por dos especies del mismo género, *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*, que son similares en cuanto a las manifestaciones clínicas. La incidencia de la coccidioidomicosis ha aumentado en los últimos diez años y se ha relacionado con factores climatológicos, movimientos de tierra (excavaciones, construcciones, minería) o viajes a áreas endémicas (Colombo et al., 2011). El número de casos registrados de coccidioidomicosis entre 1998 y 2011, aumentó de 2.265 a 22.401 en Estados Unidos. Además, de los más de 100.000 casos de coccidioidomicosis recogidos por el CDC (Centers for Disease Prevention, Estados Unidos) durante este periodo, el 97% ocurrieron en Arizona y California. La incidencia fue de 3,67 casos por cada 100.000 habitantes, falleciendo 70 pacientes al año (Centers for Disease and Prevention, 2013).

Tras la inhalación de las artroconidias se puede producir una infección respiratoria pero en la mayoría de los casos es asintomática (Nguyen et al., 2013). Puede aparecer una infección diseminada en individuos con factores de riesgo como la pertenencia a ciertas etnias, inmunosupresión o embarazo (Hooper et al., 2007; Nguyen et al., 2013). En individuos infectados por el VIH, suele producir neumonía y en los casos más graves, tras la diseminación, meningitis (Laniado-Laborin, 2007). Anteriormente a la introducción de la terapia antirretroviral de gran eficacia, la coccidioidomicosis afectaba entre el 10 y el 25% de los pacientes VIH de área endémica con una mortalidad asociada del 40% (Galgiani y Ampel, 1990). Sin embargo, tras la aparición de la terapia antirretroviral se ha producido una importante

disminución. Esto se ve reflejado en un estudio realizado entre 2003 y 2008, en el que sólo el 11,3% de los pacientes VIH de área endémica desarrollaron coccidioidomicosis con una incidencia anual del 0,9%, similar a la de la población general de la zona (Ampel, 2005; Ampel, 2007; Ampel, 2010). En América Latina la incidencia varía en función del país. Aunque en Méjico se han descrito 2-3 casos por cada 100.000 habitantes, la incidencia real en otras regiones se desconoce puesto que no es una infección de obligada declaración (Ampel, 2005; Ampel, 2007; Laniado-Laborin, 2007). Al ser una infección inexistente en Europa, el diagnóstico de los casos importados es muy complejo.

1.1.5. Neumocistosis

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* afecta principalmente a individuos infectados por el VIH, donde es una de las enfermedades fúngicas oportunistas más frecuentes (Dworkin et al., 2000). Se ha estimado que la incidencia de neumonía por *P. jirovecii* es superior a 400.000 casos por año, de los cuales aproximadamente 100.000 se producirían en países desarrollados con una tasa de mortalidad asociada entre el 30 y el 85% (Figura 1). En los últimos años, el uso de los antirretrovirales y la profilaxis con cotrimoxazol han producido una disminución de su incidencia en los países desarrollados (Carmona y Limper, 2011). Por el contrario, se ha descrito un aumento de la neumocistosis en el África Subsahariana donde se consideraba un patógeno raro (Fisk et al., 2003; Schoffelen et al., 2013). Además, en países desarrollados, se ha descrito neumocistosis en pacientes con otro tipo de inmunosupresión como alteraciones hematológicas, trasplantados o pacientes con terapia prolongada con corticoides o metotrexato (Watanabe et al., 2012). También se ha descrito que la neumocistosis puede contribuir al empeoramiento de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y, con ello, a elevar la mortalidad asociada hasta los tres millones de fallecimientos anuales (Brown et al., 2012; Brown et al., 2014).

1.2. Situación actual del diagnóstico de la infección fúngica invasora

La ausencia de síntomas tempranos y específicos condiciona la sospecha diagnóstica de la infección fúngica invasora, especialmente en individuos inmunocomprometidos (Perfect, 2013). Es conocido que un diagnóstico temprano y preciso con un tratamiento acorde aumenta significativamente la supervivencia. (Ostrosky-Zeichner, 2012).

1.2.1. Métodos convencionales y sus limitaciones

Los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico se basan en la visualización directa de las muestras mediante tinciones específicas para hongos, la observación de los tejidos mediante histopatología y el cultivo (Hsu et al., 2011). Aunque el examen directo y el cultivo pueden resultar útiles en el caso de las micosis superficiales, la utilidad de estas técnicas es muy limitada en el caso de las micosis sistémicas (Cuenca-Estrella et al., 2008; Garey et al., 2006).

Las técnicas de microscopía incluyen la visualización de las muestras en fresco y el examen histopatológico. Estos procedimientos tienen limitaciones debido a que la visualización de las estructuras fúngicas no es indicativa del estadio de la infección, y además es inespecífica, puesto que diferentes especies adoptan el mismo patrón morfológico (Cuenca-Estrella et al., 2011; Cuenca-Estrella et al., 2008). De forma general se pueden diferenciar levaduras, hongos filamentosos y hongos dimórficos pero resulta imposible saber de qué especie se trata (Perfect, 2013). Además, no siempre es posible obtener una muestra de biopsia debido a la enfermedad de base del paciente (Almyroudis y Segal, 2009). Sin embargo, existen casos en los que las técnicas de microscopía son de gran utilidad. Así, debido a que *P. jirovecii* no crece en los medios habituales de cultivo, el diagnóstico de la neumocistosis se realiza fundamentalmente en base a la visualización microscópica del microorganismo (Kaouech et al., 2009). Entre las tinciones más empleadas destacan Giemsa, plata metanamina de Grocott, ácido peryódico de Schiff, azul de toluidina o calcofluor que tienen una sensibilidad de entre el 50-90% y una especificidad superior al 95% (Procop

et al., 2004; Tasaka y Tokuda, 2013). Además, se han desarrollado técnicas de inmunofluorescencia directa o indirecta que tienen valores de sensibilidad cercanos al 90% cuando se emplean en muestras de lavado broncoalveolar o aspirados bronquiales (Choe et al., 2014; Tasaka y Tokuda, 2013). En el caso de la meningitis criptocócica, la tinción de tinta china suele ser positiva entre el 20-50% de los pacientes aunque puede alcanzar el 80% en pacientes infectados por VIH (Hsu et al., 2011).

El cultivo microbiológico es el método de referencia para el diagnóstico de infección fúngica aunque su sensibilidad es muy baja y varía en función de la especie (Hsu et al., 2011). Los hemocultivos se consideran el método de referencia para las candidemias pero son positivos en menos del 50% de los casos (Pemán y Zaragoza, 2012). En más del 50% de los pacientes diagnosticados de candidosis profunda post-mortem, los hemocultivos habían sido persistentemente negativos durante su hospitalización (Morrell et al., 2005). Además, se ha descrito que las especies del género *Aspergillus*, los Mucorales (Barnes, 2008) o *Candida glabrata* (Ramírez Aguilar et al., 1992) se aíslan rara vez en los hemocultivos. El valor predictivo positivo de los cultivos también depende de la enfermedad de base del paciente, ya que en pacientes oncohematológicos con aspergilosis pulmonar invasora, un cultivo positivo indica infección en el 90-100% de los casos pero sólo en el 15% cuando es un paciente con VIH o con tumor de órgano sólido (Hsu et al., 2011).

En el caso de las micosis endémicas, la sensibilidad de los cultivos es muy baja. De hecho, son positivos en tan solo un 0,5% de los pacientes con coccidioidomicosis sistémica y en el 30% de los pacientes con histoplasmosis diseminada (Akpek et al., 2001; Ampel, 2010). Además, estos hongos son de crecimiento lento, ya que al menos se requieren entre 5-7 días para que las colonias sean visibles (Gómez, 2014). Para complicar aún más la situación, la manipulación de los cultivos y la identificación de los aislados tiene que hacerse en laboratorios de seguridad de nivel 3 (Buitrago y Cuenca-Estrella, 2012).

1.2.2. Detección de biomarcadores

Debido a las limitaciones del diagnóstico convencional descritas en la sección anterior, se han desarrollado técnicas alternativas basadas en la detección de distintos biomarcadores. En la actualidad, los métodos desarrollados, se basan en la detección de 1,3 β -D-glucano para la infección fúngica, de galactomanano para la aspergilosis, de mananos para la candidemia, antígeno capsular para la criptococosis y antígenos y anticuerpos en el caso de las micosis endémicas.

1.2.2.1. Detección de 1,3 β -D-Glucano en sospecha de infección fúngica

El 1,3 β -D-glucano es un polisacárido de la pared celular de los hongos, prácticamente inexistente en los Mucorales y *Cryptococcus* spp., que se libera a la sangre durante el proceso de invasión (Koo et al., 2009). Como está ausente en mamíferos, bacterias y virus, la detección de 1,3 β -D-glucano en suero es un buen marcador panfúngico de infección fúngica invasora (Obayashi et al., 2008). El ensayo más empleado es el denominado Fungitell (Associates of Cape Cod, Inc) cuyo uso ha sido aprobado para el diagnóstico de candidemia por la FDA (*Food and Drug Administration*), y recomendado por la IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) y el EORTC/MSG (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) debido a su alta sensibilidad y especificidad (Cuenca-Estrella et al., 2012; Hsu et al., 2011). Así, en un meta-análisis que investiga la utilidad del 1,3 β -D-glucano en el diagnóstico de candidosis invasora, se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad del 77% y el 85% respectivamente (Karageorgopoulos et al., 2011). Según otro estudio realizado en pacientes ingresados en la UCI quirúrgica, la determinación del 1,3 β -D-glucano consigue detectar la candidosis invasora entre 4 y 8 días antes que el hemocultivo (Senn et al., 2008). Para la neumocistosis se han descrito valores de sensibilidad entre el 90-100% y de especificidad entre 65-100% (Boyles, 2013; Cuétara et al., 2008; Del Palacio et al., 2010; Esteves et al., 2014). Además, esta técnica puede ser de utilidad para distinguir entre población infectada y colonizada, evaluar el progreso de la infección o la eficacia terapéutica (Hanson et al., 2012; Onishi et al., 2012; Sims et al., 2012).

Sin embargo, la imposibilidad de identificar la especie causante de la infección y la existencia de un buen número de factores que causan falsos positivos hacen que no sea muy utilizado en los laboratorios clínicos (Cuenca-Estrella et al., 2011). Entre las causas relacionadas con la presencia de falsos positivos destacan: la administración de inmunoglobulina, las preparaciones de albúmina contaminadas con componentes fúngicos, la realización de hemodiálisis con membranas de celulosa, la sepsis grave, el uso de gasas que contengan trazas de glucano y el tratamiento con antibióticos (P.ej. piperacilina-tazobactam) (Koo et al., 2009). Actualmente, las muestras se deben enviar a laboratorios especializados lo que retrasa el diagnóstico de una infección grave (Perfect, 2013).

1.2.2.2. Detección de Galactomanano en sospecha de aspergilosis

El galactomanano es un polisacárido de la pared celular del género *Aspergillus* y, en menor medida, de otras especies fúngicas, que se libera durante su crecimiento e invasión del tejido. El ensayo Platelia Galactomanano EIA (BioRad) fue aprobado por la FDA en 2003. Posteriormente en Europa, el grupo de estudio EORTC/MSG incluyó el resultado positivo de dicho ensayo como criterio microbiológico para la definición de aspergilosis invasora probable en muestras de suero, plasma, lavado broncoalveolar o líquido cefalorraquídeo (De Pauw et al., 2008). La determinación de galactomanano es una técnica rápida y no invasora cuya sensibilidad y la aparición de resultados falsos negativos varían en función del punto de corte. Así, se ha demostrado que la detección de galactomanano en dos sueros consecutivos con un índice mayor o igual a 0,5 aumenta la especificidad y el valor predictivo positivo de la prueba; mientras que, para una sola determinación, se recomienda un valor por encima de 0,7 (Ostrosky-Zeichner, 2012).

Los resultados de un meta-análisis han demostrado que la sensibilidad y especificidad global del ensayo del galactomanano en sangre es del 71% y 89% respectivamente para el diagnóstico de aspergilosis invasora (Pfeiffer et al., 2006). Sin embargo, es más útil en unas poblaciones de pacientes que en otras. En pacientes oncohematológicos los valores de sensibilidad y especificidad alcanzan el 90% y 98% respectivamente, mientras que en pacientes trasplantados de órgano sólido disminuyen hasta el 3% y el 78% respectivamente (Klont et al., 2004). También se ha

Introducción

evaluado la utilidad de la determinación de galactomanano como indicación del tratamiento anticipado o la monitorización de la eficacia terapéutica (Cordonnier et al., 2009; Maertens et al., 2009; Maertens et al., 2005). Otros estudios sugieren que las determinaciones seriadas de galactomanano pueden ser útiles para la evaluación de la respuesta al tratamiento, el progreso de la infección o para distinguir entre empeoramiento y el síndrome de reconstitución inmune (Miceli et al., 2008).

Finalmente, una de las limitaciones de esta técnica es el elevado número de falsos positivos que aparecen entre la población pediátrica, así como en pacientes tratados con antibióticos betalactámicos, o la presencia de reacciones cruzadas con otras micosis (peniciliosis, histoplasmosis o blastomicosis, fusariosis). Además, la profilaxis o el tratamiento empírico con antifúngicos disminuyen considerablemente la sensibilidad de la técnica (Klont et al., 2004; Mennink-Kersten et al., 2004a; Mennink-Kersten et al., 2004b; Viscoli et al., 2004).

1.2.2.3. Detección de antígeno manano-anticuerpo antimanano en candidosis

El manano es un glicano con incorporación de manosa presente en la pared celular de las especies de *Candida* y tiene propiedades inmunogénicas. La detección combinada de anticuerpos y antígenos manano en suero de pacientes con candidosis invasora tiene una sensibilidad del 80% y una especificidad del 93% para *C. albicans* (Pontón, 2009). Sin embargo esta sensibilidad disminuye cuando es otra la especie involucrada (Mikulska et al., 2010). A pesar de la comercialización de ensayos para la determinación de antígeno manano y anticuerpo antimanano, como el Platelia *Candida* (Biorad), su baja sensibilidad hace que sean poco utilizados en clínica.

1.2.2.4. Determinación de antígeno de *Cryptococcus*

El ensayo para la determinación del antígeno capsular de *Cryptococcus* se desarrolló a finales de los setenta aunque debido a su elevada sensibilidad se sigue utilizando (Bennett et al., 1977). En la actualidad se comercializa en formato de sistema de aglutinación en látex o ELISA. Su eficacia varía en función del estado de inmunosupresión del paciente y el tipo de muestra empleada (La Hoz y Pappas, 2013). En pacientes con SIDA y meningitis criptocócica la detección de antígeno capsular en

líquido cefalorraquídeo o suero es positiva en más del 99% de los casos, mientras que en otros pacientes con otra enfermedad de base, la detección en suero es sólo positiva en el 30% (Kralovic y Rhodes, 1998). En pacientes inmunocompetentes, el ensayo tiene mejor sensibilidad en líquido cefalorraquídeo o lavado broncoalveolar que en suero (Hsu et al., 2011).

Recientemente, se ha desarrollado un inmunoensayo para el diagnóstico inmediato de criptococosis (“point of care testing”) basado en la detección del antígeno capsular (Jarvis et al., 2011). Dicho ensayo ha sido aprobado por la FDA para su uso en suero y líquido cefalorraquídeo y se caracteriza por ser estable a temperatura ambiente, así como rápido y económico. Estudios recientes señalan unos valores de sensibilidad y especificidad del 99% y 97% respectivamente en líquido cefalorraquídeo de pacientes infectados por VIH y con meningitis criptocócica (Boulware et al., 2014; Dhana, 2013).

1.2.2.5. Detección de la interacción antígeno-anticuerpos en micosis endémicas

El diagnóstico de las micosis endémicas es trabajoso, caro y lento. Por ello, se han desarrollado diversas técnicas de detección de antígenos y anticuerpos que en combinación con otras técnicas diagnósticas resultan de gran utilidad.

En el caso de la histoplasmosis, la determinación antigénica se realiza principalmente en orina, aunque también se puede hacer en sangre o lavado broncoalveolar. El sistema más empleado es un ELISA, desarrollado por Immy diagnostics (Oklahoma Alpha Histoplasma EIA Test Kit,) el cual tiene una sensibilidad y especificidad global del 81% y 99% respectivamente (Theel et al., 2013). De hecho, en pacientes inmunodeprimidos con histoplasmosis pulmonar subaguda y crónica la sensibilidad del ensayo es superior al 95% (Srinivasan et al., 2009; Wheat, 2009; Zhang et al., 2013). Sin embargo, existe reacción cruzada con otros hongos endémicos (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*) y *Aspergillus* (Connolly et al., 2007).

Otra técnica de referencia es un ELISA disponible en el laboratorio Miravista (Indianapolis, Estados Unidos) que presenta una sensibilidad del 92% y del 100% en

Introducción

orina y suero respectivamente de pacientes con infección diseminada (Hage et al., 2011; Theel et al., 2013). Sin embargo, en pacientes con histoplasmosis pulmonar aguda o crónica la sensibilidad disminuye al 70% (Wheat, 2009). El 70% de los pacientes con blastomicosis tiene un resultado positivo en esta prueba, lo que complica su uso en área endémica de ambos patógenos (Gómez, 2014).

En cuanto a la detección de anticuerpos, existen pocas técnicas comerciales (Immy Diagnostics, Meridien, Diamedix) las cuales se basan en la fijación del complemento o en la inmunodifusión (Zhang et al., 2013). Tienen una sensibilidad entre 30-70% en función del cuadro clínico y la enfermedad de base del paciente. Así, el 50% de los pacientes inmunocomprometidos tienen resultados falsos negativos. Además, hay que tener en cuenta que la seroconversión ocurre tras las 2-6 semanas y los títulos de anticuerpos pueden permanecer elevados durante años tras la infección primaria, con lo cual un resultado positivo no aclara si es una infección pasada, crónica o una recidiva (Hamilton, 1998; Hsu et al., 2011).

Para el diagnóstico de la coccidioidomicosis, las técnicas de detección de anticuerpos son las más empleadas. Esto se debe a que el sistema comercial de ELISA específico para *Coccidioides* spp. presenta una sensibilidad del 70% en pacientes con infección diseminada (Wheat, 2009). Hasta hace unos años, la prueba cutánea para la detección de anticuerpos frente a la esferulina o la coccidioidina, era el método de serodiagnóstico más empleado. Sin embargo, estos anticuerpos se han detectado en el 70% de la población de área endémica (Nguyen et al., 2013). En la actualidad, los ensayos comerciales de serodiagnóstico para la coccidioidomicosis se basan en la detección de IgM o IgG en formato de ELISA, mediante la fijación del complemento o en inmunodifusión. La sensibilidad global es del 80% en los ensayos que detectan tanto IgG como IgM pero pueden ser negativos en los estadios tempranos de infección. La probabilidad de falsos positivos es muy elevada cuando sólo se evalúa IgM (82%) y tienen sensibilidad reducida (50%) en pacientes inmunodeprimidos (Ampel, 2005; Blair y Currier, 2008; Blair et al., 2013; Kuberski et al., 2010; Nguyen et al., 2013).

1.2.3. PCR en tiempo real para el diagnóstico de infección fúngica invasora

El método de amplificación de ADN mediante PCR fue descrito a mediados de los ochenta adaptándose rápidamente en los laboratorios clínicos para la detección de ADN de microorganismos, fundamentalmente de virus (Khot y Fredricks, 2009). Sin embargo, las técnicas de PCR no se consideran como métodos de referencia para la detección de hongos causantes de infección en humanos (Perfect, 2013) y tampoco se han incluido en los criterios EORTC/MSG para definir infección probable (De Pauw et al., 2008). Esto se debe principalmente a que los métodos de PCR existentes para el diagnóstico de la infección fúngica están circunscritos a ciertos laboratorios y no han sido completamente estandarizados.

La mayoría de los métodos desarrollados en micología se basan en la detección de ácidos nucleicos mediante PCR cuantitativa o en tiempo real, para el diagnóstico de la aspergilosis invasora y la candidemia (Tabla 1). Estudios recientes de meta-análisis, demuestran que la sensibilidad y especificidad de estas técnicas son del 92% y 95% respectivamente, en el caso de la candidemia (Avni et al., 2011) y del 88% y 75% en el caso de la aspergilosis invasora (Mengoli et al., 2009). Los procedimientos más novedosos permiten la detección de varias especies simultáneamente (Cuenca-Estrella et al., 2009; Lau et al., 2010; McMullan et al., 2008). Esto es importante ya que distintas especies del mismo género pueden tener un tratamiento antifúngico diferente (Alastruey-Izquierdo et al., 2007; Alcázar-Fuoli et al., 2008; Arendrup, 2013). Asimismo, permiten la detección de infecciones mixtas (Kirby et al., 2004). Se ha descrito también que el uso de las técnicas de detección de ADN en combinación con la detección de biomarcadores aumenta la sensibilidad al 98% en el caso de la candidosis invasora (McMullan et al., 2008) y al 100% para la aspergilosis invasora (Cuenca-Estrella et al., 2009). Igualmente, con el uso de la PCR diagnóstica, se podría iniciar el tratamiento hasta 14 días antes que con los métodos convencionales (Halliday et al., 2006). Actualmente, se está investigando el impacto que estas técnicas pueden tener en el manejo de los pacientes. Así, se ha observado que la

Introducción

administración de antifúngicos en base a un resultado positivo de PCR reduciría los costes del tratamiento en un 20% (Halliday et al., 2006).

La PCR es una herramienta prometedora para diagnosticar candidosis y aspergilosis invasora. Sin embargo, en pacientes en riesgo de una infección fúngica diferente el desarrollo ha sido prácticamente inexistente.

En el caso de la criptococosis los sistemas basados en PCR a tiempo real no se encuentran muy desarrollados (Qishui et al., 2012; Veron et al., 2009) ya que los sistemas de detección de antígeno son sensibles y económicos como se ha descrito en la sección anterior. En los últimos años, se ha realizado un gran esfuerzo en el desarrollo de PCR diagnósticas para la neumocistosis las cuales varían en cuanto a la diana amplificada (ADN mitocondrial, ITS, DHFR, HSP70, etc.). La sensibilidad y especificidad de estas técnicas en comparación con el examen directo es superior al 90%. Sin embargo, entre el 50-70% de los pacientes colonizados sin neumonía pueden presentar un resultado de PCR positivo (Fan et al., 2013). Actualmente, no se ha definido un valor umbral para distinguir entre pacientes colonizados e infectados. Aunque se han descrito valores de 1000 células/ml, diversos estudios indican que diferentes poblaciones de pacientes van a requerir valores umbrales diferentes (Botterel et al., 2012; Dalpke et al., 2013; Matsumura et al., 2012; Muhlethaler et al., 2012). Se ha señalado que aproximadamente en el 30% de los pacientes inmunodeprimidos en los que se pensó que el resultado de la PCR era un falso positivo, finalmente tenían neumocistosis (Fan et al., 2013). Por ello, en la actualidad un resultado positivo de PCR debe ser evaluado por el clínico junto con la sintomatología del paciente. Además, para el diagnóstico de neumocistosis se han desarrollado varios ensayos comerciales aunque el único evaluado en diversos estudios es el *Myc Pneumocystis Assay* (Myconostica) que presenta valores de sensibilidad del 90% y especificidad del 100% en lavado broncoalveolar. Sin embargo, el valor predictivo positivo depende del factor de riesgo del paciente siendo del 60% en paciente trasplantado sometido a terapia con corticoides, 90% en paciente crítico y 100% en paciente infectado por VIH (Hauser et al., 2011; McTaggart et al., 2012; Orsi et al., 2012).

El desarrollo de la PCR diagnóstica en el caso de la histoplasmosis está más avanzado que en otras micosis endémicas. Este hecho es especialmente importante debido a que la prevalencia de esta infección en zonas endémicas es muy elevada en individuos infectados con VIH, el diagnóstico serológico no está siempre disponible y el cultivo es muy lento (Gómez, 2014). De este modo, se han desarrollado diferentes protocolos tanto de PCR en tiempo real como convencional dirigidos a la amplificación de la región transcrita interna, ITS (Buitrago et al., 2006) o de genes de copia única como el Hc100p o el SCAR220 (Bialek et al., 2002; Bialek et al., 2001; Martagon-Villamil et al., 2003). Según un estudio multicéntrico reciente, la sensibilidad y especificidad global de los métodos de PCR que se evaluaron en dicho trabajo para la detección de *H. capsulatum* (convencional y tiempo real) fue del 86% y el 100% respectivamente (Buitrago et al., 2013b) siendo más sensibles los métodos basados en PCR en tiempo real que los que se basaban en PCR convencional. Con respecto a las otras micosis endémicas (coccidioidomicosis, blastomicosis o paracoccidioidomicosis), el desarrollo de herramientas de PCR diagnóstica no se encuentra muy avanzado. La mayor parte de los protocolos descritos están circunscritos a ciertos laboratorios de referencia y la validación se restringe a cepas clínicas y biopsias (Binnicker et al., 2007; Pitz Ade et al., 2013; Sidamonidze et al., 2012).

Otra aproximación en el diagnóstico de la infección fúngica invasora ha sido el desarrollo de técnicas panfúngicas basadas en PCR cuantitativa. Estas técnicas son útiles cuando se ha visualizado el hongo en los tejidos pero no existe una clara sospecha clínica ni epidemiológica de la especie que puede estar implicada en la infección y, además, las otras técnicas, como el cultivo dan resultados negativos (Buitrago et al., 2014). La PCR panfúngica tiene la desventaja de que no se realiza con sondas específicas sino con cebadores universales y empleando agentes intercalantes (ej. Sybergreen) y por tanto, los productos amplificados necesitan ser secuenciados lo que retrasa el diagnóstico definitivo (Buitrago et al., 2014). Además, la PCR panfúngica no puede usarse como técnica de cribado, ni tampoco para el diagnóstico rápido debido a que la sensibilidad en muestras de fácil obtención como suero y sangre es del 70%, mientras que en tejido (parafinado o en fresco) alcanza el 87% (Buitrago et al., 2013a; Landlinger et al., 2010; Lau et al., 2010).

Introducción

En la Tabla 1 se muestra una revisión de los trabajos más relevantes publicados sobre PCR en los últimos años. Como se puede ver, hay una gran predominancia de las publicaciones sobre la aspergilosis y la candidosis frente al resto de los patógenos fúngicos.

Por último, las aproximaciones más recientes corresponden al desarrollo de técnicas de PCR diagnósticas en formato múltiple. Estas técnicas permiten detectar en un solo tubo las especies más frecuentemente implicadas en la infección o identificar el microorganismo causante de un síndrome o un proceso con características clínicas indistinguibles. En la literatura aparecen trabajos orientados a la detección de microorganismos causantes de meningitis (Wang et al., 2012), enfermedad febril sistémica (Waggoner et al., 2014) o para la detección de *P. jirovecii* o *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes infectados con VIH (Boondireke et al., 2010).

En los últimos años, se está realizando un gran esfuerzo para tratar de resolver la falta de consenso, en el uso de la PCR cuantitativa en tiempo real como técnica diagnóstica. Por ello, han surgido algunas iniciativas como la europea, European *Aspergillus* PCR Initiative (EAPCRI). Este estudio multicéntrico está constituido por más de 60 centros en Europa y en Australia y tiene como finalidad estandarizar la metodología de la PCR diagnóstica de *Aspergillus* spp., definir protocolos, tipo de muestra más adecuada o método de extracción de ADN más eficiente (White et al., 2010). Este proceso aún está en desarrollo y, una vez que se finalice y establezca un consenso será necesario evaluar la utilidad clínica mediante ensayos clínicos a gran escala. Se han realizado también otros estudios multicéntricos para evaluar los métodos de PCR para el diagnóstico de histoplasmosis (Buitrago et al., 2013b); o para el diagnóstico de mucormicosis (Dannaoui et al., 2010) aunque en general, a excepción del diagnóstico de la aspergilosis, estos estudios son escasos todavía.

REFERENCIA	INFECCIÓN	DIANA	MUESTRA	S	E	VPP	VPN
(Nguyen et al., 2012)	CI	ITS	Suero, sangre y plasma	81-75%	67-73%	I	I
(Lau et al., 2010)	CI	ITS	Suero y sangre	75%	97%	95%	85%
(Westh et al., 2009)	CI	18S, 5.8S	Sangre	50%	97%	25%	99"
(von Lilienfeld-Toal et al., 2009)	CI	ITS	Suero	0%	97%	0%	98.5%
(Khlif et al., 2009)	CI	18S	Sangre	81%	96%	91%	91%
(McMullan et al., 2008)	CI	rDNA	Sangre	70%	100%	100%	97.7%
(Hummel et al., 2006)	AI	18S	Sangre	43%	100%	100%	20%
(Florent et al., 2006)	AI	mtDNA	Suero	100%	55%	10%	100%
(Lass-Flori et al., 2004)	AI	18S	Sangre	40%	100%		44%
(Kawazu et al., 2004)	AI	18 S	Plasma	90%			
(Cuenca-Estrella et al., 2009)	AI	ITS	Sangre y suero	91.6%	94.4%	73.3%	98.5%
(Reinwald et al., 2012)	AI	18S	Tejido	86%	65%		
(Botterel et al., 2012)	PJP	mtDNA	Lavado broncoalveolar	97%	94%		
(Matsumura et al., 2012)	PJP	DHPR	Respiratoria	96%	100%		
(Muhlethaler et al., 2012)	PJP	Timidilato sintasa	Respiratoria	96%	90%	98%	
(Veron et al., 2009)	Criptococosis	ITS2	LAB, médula ósea y LCR	100%	100%		
(Buitrago et al., 2006)	Histoplasmosis	ITS	LBA, médula ósea y suero	100-70%			
(Bernal-Martínez et al., 2013)	Mucormicosis	ITS		100%			
(Dannaoui et al., 2010)	Mucormicosis	ITS	Tejido parafinado	93%			

Tabla1: Estudios de validación de PCR en tiempo real para el diagnóstico de infección fúngica invasora más relevantes de los últimos diez años. La tabla incluye datos de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivos negativo (VPN) así como la diana empleada para la amplificación, el tipo de muestra y la infección objeto del diagnóstico. CI: Candidosis invasora, AI: Aspergilosis invasora, PJP: neumocistosis. Modificado de (Kourkoumpetis et al., 2012).

1.3. Métodos moleculares de identificación de hongos patógenos humanos: métodos clásicos y nuevas técnicas basadas en análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM)

Actualmente, el método de referencia para identificar hongos a nivel de especie es la secuenciación de dianas informativas. Se ha acordado que sea la región espaciadora interna (ITS) del ADN ribosómico (rADN) la diana de referencia para la identificación molecular de hongos (Figura 2). El ADN ribosómico contiene copias múltiples repetidas en tándem de los genes que codifican para el ARN ribosómico (5,8S, 18S y 26S) separados por regiones ITS (ITS-1 e ITS-2) que se transcriben pero no se traducen (Schoch et al., 2012). Cada una de estas unidades, están repetidas un número variable de veces en función de la especie y separadas por las regiones intergénicas, IGS-1 e IGS-2. Para la mayoría de los hongos, las regiones ITS-1 e ITS-2 son suficientemente variables para identificar a nivel de especie (Begerow et al., 2010). Sin embargo, para algunas especies el grado de divergencia de la región ITS es limitado y se han buscado dianas con mayor poder de resolución. Entre estos nuevos marcadores están los genes que codifican para el factor de elongación 1α (EF- 1α), la β tubulina, la calmodulina o la región espaciadora intergénica (Rodríguez-Tudela et al., 2008). Así, para algunos géneros de hongos se ha visto que la IGS permite la identificación de la especie llegando incluso a variabilidad intraespecífica (Mekha et al., 2010; Sugita et al., 2003; Sugita et al., 2002; Sugita et al., 2004). Aunque se han descrito diferencias en la IGS, tanto en longitud como en composición nucleotídica entre algunas especies relacionadas, esta región ha sido muy poco explorada (Cornet et al., 2011). Por tanto, su análisis en profundidad podría ser útil para identificar especies en las cuales el análisis de otras dianas no proporciona un resultado muy robusto.

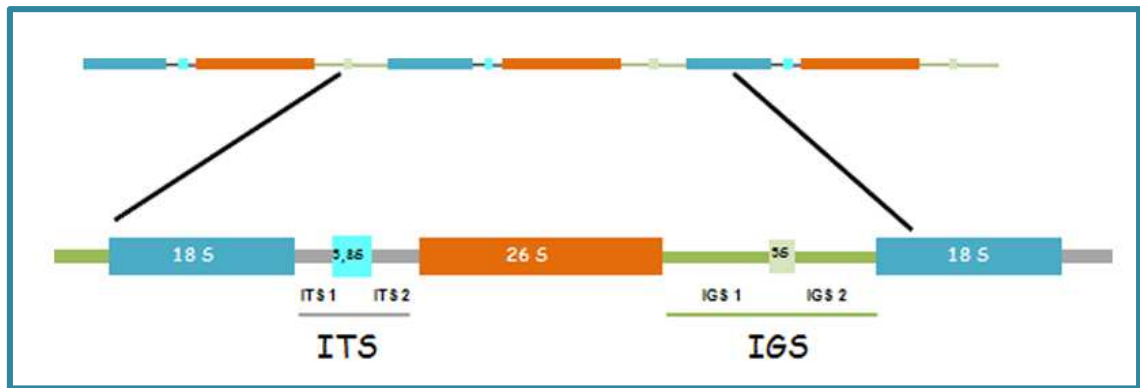


Figura 2: Organización del ADN ribosómico.

La identificación molecular definitiva de la especie requiere además de una base de datos de secuencias bien construida con la que comparar la secuencia problema obtenida. Actualmente existen diversas bases de datos como es GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) o el ENA del EBI (European Bioinformatic Institute) que poseen secuencias génicas de muchos organismos. También hay otras más especializadas como Mycobank del CBS (Fungal Biodiversity Centre) o Mycologylab de la Universidad de Sydney que están dedicadas únicamente a secuencias de ITS del rADN de hongos. Todas estas bases de datos son públicas, de acceso libre y comparten las secuencias depositadas. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones, en general el número de secuencias de hongos patógenos disponibles representan un pequeño porcentaje de las especies existentes y además se ha estimado que en el GenBank cerca de un 20% están identificadas de forma errónea (Nilsson et al., 2006).

En el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología se dispone de una base de datos que contiene más de 13.000 entradas de regiones génicas informativas (ITS, IGS, EF-1 α , β -tubulina, rodlet, microsatélites y D1-D2) procedentes de cepas clínicas de hongos filamentosos y levaduras, así como de cepas tipo y de referencia de otras colecciones (CBS, ATCC, CECT). Esta base de datos está acreditada según la norma UNE-EN-ISO 15189 y se usa de forma rutinaria para la identificación de hongos patógenos.

Este tipo de herramientas sólo están disponibles en un número reducido de laboratorios en el mundo y por tanto es necesario el desarrollo de otras herramientas

Introducción

más sencillas que permitan identificar a nivel de especie y subespecie a aquellos patógenos de importancia clínica.

El análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM) es una técnica relativamente reciente y ha resultado útil para la identificación (Douarre et al., 2012), genotipado (Levesque et al., 2011), y análisis de mutaciones en genes implicados en la resistencia a los antimicrobianos (Daniels et al., 2012). Este método de análisis de los productos amplificados mediante PCR en tiempo real puede detectar fragmentos que difieren en un solo nucleótido en su secuencia (Odell et al., 2005). Durante la amplificación, una molécula fluorescente con capacidad para saturar el ADN (Resolight, Evagreen o LCGreen) se intercala de forma estable entre el ADN de doble cadena. Tras la amplificación, los productos de PCR van a ser desnaturalizados y rápidamente renaturalizados lo que ocasiona cambios en la fluorescencia relacionados, tanto con la longitud como con la composición de nucleótidos. De ahí, que estas técnicas resulten especialmente útiles para la determinación de variables alélicas (Figura 3).

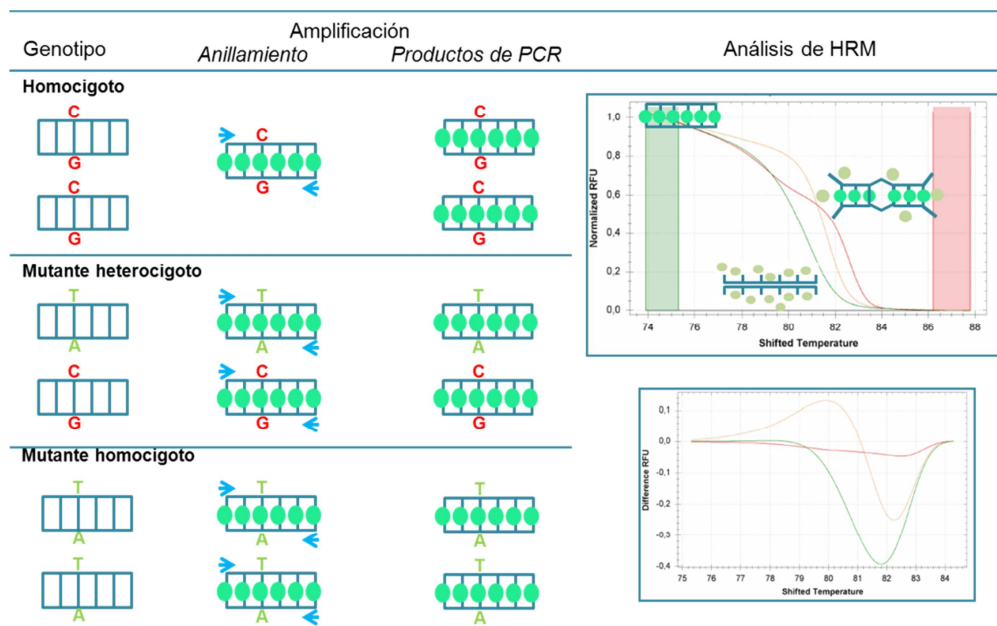


Figura 3: Representación esquemática del análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM) para la determinación de polimorfismos de una sola base. Las flechas indican la posición de los cebadores en la reacción de amplificación. El fluoróforo tiene afinidad por el ADN de doble cadena de modo que sólo cuando se une a éste, la fluorescencia es suficiente como para ser detectada por el sistema de detección. Los nucleótidos despareados se muestran como líneas en diagonal. Los productos de PCR de alelos homocigotos (naranja), mutantes heterocigoto (rojo) o mutantes homocigoto (verde) son analizados tras amplificación mediante normalización de la fluorescencia.

Este método se ha utilizado para la identificación de bacterias de diferentes géneros (Slany et al., 2010), para detección de especies con distinta sensibilidad a los antimicrobianos (Yin et al., 2013) o de aquellas que causan sepsis frecuentemente (Ozbak et al., 2012). Una de las primeras aplicaciones del HRM fue para la identificación del grupo *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* (Odell et al., 2005). Sin embargo, esta técnica se ha utilizado poco para la identificación de hongos, circunscribiéndose a especies del género *Candida* y Mucorales (Arancia et al., 2011; Hrnčirova et al., 2010; Somogyvari et al., 2012). En todas ellas hay un déficit claro de estandarización y validación de las técnicas aunque cabe destacar su potencial utilidad.

Debido a su simplicidad, el HRM podría suponer también una excelente alternativa a las actuales técnicas de genotipado. Dos de las técnicas más reproducibles y eficaces para la tipificación son, el análisis de la longitud de regiones de microsatélites y la tipificación de secuencias multilocus (MLST). Aunque estas técnicas presentan un gran poder de discriminación, son técnicas complejas, costosas y prácticamente circunscritas a laboratorios de referencia (Vanhee et al., 2010).

2. OBJETIVOS

De acuerdo con las necesidades actuales en el diagnóstico de la infección fúngica invasora e identificación de las especies causantes de la misma, los objetivos planteados en este trabajo son:

Primero:

Desarrollo y validación de técnicas de PCR en tiempo real usando sondas de tipo *molecular beacon* para:

- a. Diagnóstico e identificación de especies de hongos causantes de neumonías oportunistas (*Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis jirovecii* y *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii*).
- b. Diagnóstico de coccidioidomicosis en área endémica.

Segundo:

Desarrollo de técnicas rápidas de identificación y tipificación de especies fúngicas basadas en el análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM) para:

- a. La identificación de especies del complejo *Cryptococcus gattii-neoformans*.
- b. La identificación de las especies del complejo *psilosis*: *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*.
- c. Diferenciación molecular entre cepas de *Candida albicans* causantes de infecciones recurrentes.

3. OBJETIVO PRIMERO:

**Desarrollo de técnicas de PCR
cuantitativa diagnóstica**

3.1. Diagnóstico e identificación de hongos que causan infección oportunista en pacientes infectados con VIH (*Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* y *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*) mediante PCR en tiempo real

El 70% de los pacientes infectados con el VIH tienen complicaciones pulmonares durante el curso de la infección. La importancia del diagnóstico diferencial de las especies responsables de los episodios de neumonía se debe a que los patógenos fúngicos que los causan con más frecuencia (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* y *Pneumocystis jirovecii*) presentan una clínica similar y diferencias en el tratamiento. Por ello, se desarrolló una técnica de diagnóstico molecular basada en PCR en tiempo real para la detección simultánea de estas tres especies. La metodología desarrollada pretende la identificación de las tres especies mediante el diseño de sondas tipo *molecular beacon* dirigidas a la región ITS del ADN ribosómico. Además, se incluyó un control interno para monitorizar posibles procesos de inhibición de la reacción. La estandarización se realizó empleando 24 cepas clínicas y 43 muestras de pacientes con SIDA. Asimismo, para los ensayos de especificidad se evaluaron 21 cepas de especies no relacionadas y 29 muestras clínicas de pacientes con otra afección.

La técnica presentó gran sensibilidad (100%) y especificidad in vitro (100%) y coeficientes de variación cercanos al 3%. El límite de detección fue de 2 fg de ADN genómico por reacción para *H. capsulatum* y *C. neoformans*, y 2,92 log₁₀ copias de ADN plasmídico en 20 µl de reacción en el caso de *P.jirovecii*. La validación clínica de la técnica mostró valores de sensibilidad del 90,75% y de especificidad del 100% en las muestras analizadas. Asimismo, el 92,5% de los pacientes con infección probada tuvieron un resultado positivo por la técnica de PCR desarrollada. Para uno de los pacientes con histoplasmosis probada de acuerdo a los criterios EORTC/MSG, se pudo detectar además ADN de *P. jirovecii* en el lavado broncoalveolar.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la técnica de detección múltiple de especies presentada en esta memoria, es un procedimiento rápido, sensible y altamente específico que podría tener gran utilidad clínica en regiones en desarrollo.



A Multiplex Real-Time PCR Assay for Identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* in Samples from AIDS Patients with Opportunistic Pneumonia

Sara Gago,^a Cristina Esteban,^b Clara Valero,^a Óscar Zaragoza,^a Jorge Puig de la Bellacasa,^b María José Buitrago^a

Mycology Department, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^a; Department of Clinical Microbiology, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain^b

A molecular diagnostic technique based on real-time PCR was developed for the simultaneous detection of three of the most frequent causative agents of fungal opportunistic pneumonia in AIDS patients: *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*. This technique was tested in cultured strains and in clinical samples from HIV-positive patients. The methodology used involved species-specific molecular beacon probes targeted to the internal transcribed spacer regions of the rDNA. An internal control was also included in each assay. The multiplex real-time PCR assay was tested in 24 clinical strains and 43 clinical samples from AIDS patients with proven fungal infection. The technique developed showed high reproducibility (r^2 of >0.98) and specificity (100%). For *H. capsulatum* and *Cryptococcus* spp., the detection limits of the method were 20 and 2 fg of genomic DNA/20 μ l reaction mixture, respectively, while for *P. jirovecii* the detection limit was 2.92 log₁₀ copies/20 μ l reaction mixture. The sensitivity *in vitro* was 100% for clinical strains and 90.7% for clinical samples. The assay was positive for 92.5% of the patients. For one of the patients with proven histoplasmosis, *P. jirovecii* was also detected in a bronchoalveolar lavage sample. No PCR inhibition was detected. This multiplex real-time PCR technique is fast, sensitive, and specific and may have clinical applications.

HIV infection remains a threat for many people, as it is estimated that almost 34 million adults and children worldwide are infected with the virus, according to WHO/UNAIDS (1). Although mortality associated with HIV infection has decreased in recent years due to the development of highly active antiretroviral therapy (HAART), the incidence and mortality rates of non-AIDS-associated infections remain high, particularly in nondeveloped countries (1). Opportunistic pneumonias are one of the major causes of pulmonary complications among AIDS patients. In fact, almost 70% of people infected with HIV suffer at least one pulmonary complication during the course of the infection (2). Although in early HIV infection the agents that cause pneumonia are similar to those found in the general population, when the number of CD4⁺ T cells decreases, opportunistic pneumonias are associated with high morbidity and mortality (3–5). Tuberculosis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP; the abbreviation PCP reflects the previous nomenclature for the *Pneumocystis* species causing opportunistic pneumonia in humans, *P. carinii*; *P. jirovecii* is now recognized as the species that infects humans) are the most commonly reported AIDS-defining illnesses (6). Moreover, opportunistic pneumonias due to *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus* spp. in immunocompromised patients involve high morbidity and mortality in areas where the virus is not endemic or in those regions where the infection is not very common. *P. jirovecii* has been described as the main cause of pulmonary complication in AIDS patients in developed countries; in fact, in the United States it has been estimated that 75% of HIV-positive persons suffer PCP during their lifetime (7, 8). Clinical diagnosis of PCP is based mainly on microscopic procedures performed directly on the clinical sample and usually involves immunofluorescence mi-

croscopy (IFA) or use of Grocott's methenamine silver stain (9, 10). Recently, some reports have described the utility of real-time PCR (rt-PCR) protocols to increase the sensitivity and specificity of PCP diagnosis (11–17), and some of these tests have been commercialized (18). Moreover, a recent study showed the utility of rt-PCR assays for the early diagnosis and treatment of non-HIV-infected patients diagnosed with PCP, for whom a definitive diagnosis could be performed using rt-PCR techniques that detected the low fungal burden present in the patients (19).

Histoplasmosis is a mycosis that is endemic in the United States and Africa that can produce disseminated infection associated with high morbidity and mortality in HIV patients (20–22). Due to travel and immigration, this infection has increased in recent years in areas where *H. capsulatum* mycosis is not endemic (23). Although culture is the reference procedure for the diagnosis of histoplasmosis, it is time-consuming (requiring 3 to 4 weeks of incubation) (24). In fact, the sensitivity and specificity of microscopy-based approaches are very low, and fungal structures are only observed when the infection is advanced. Moreover, serology has shown significant limitations in AIDS patients; it may be negative in 50% of such patients (25). Antigen

Received 16 October 2013 Returned for modification 13 December 2013

Accepted 24 January 2014

Published ahead of print 29 January 2014

Editor: D. W. Warnock

Address correspondence to María José Buitrago, buitrago@isci.ies.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02895-13

detection could be useful for these patients, although it is only available in the United States (26). Several rt-PCR protocols with varied sensitivities and specificities have been described for detection of DNA from *Histoplasma capsulatum* in clinical samples (27–29). Recently, a comparison of different protocols for detection of *H. capsulatum* DNA by PCR showed that the sensitivity of the assay depended on both the selected target region and the type of amplification assay (conventional or rt-PCR) (24). Herein, the most sensitive and specific protocols were based on the amplification of the internal transcribed spacer (ITS) by rt-PCR (30), and the less sensitive protocols were based on the amplification of monocopy genes (Hc100p and SCAR²²⁰) by conventional PCR (31, 32).

In Africa, cryptococcosis, caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* or *C. neoformans* var. *grubii*, is one of the main causes of mortality associated with HIV infection (33). However, in the northwest United States, *Cryptococcus gattii* is the primary causative agent of cryptococcosis and can also affect immunocompetent people; it has been classified endemic in some regions of the eastern United States, and several cases of cryptococcosis outside that area where the disease is endemic have been reported recently (34–36). This infection can produce both meningitis and pulmonary complications in these patients (37, 38). Routine clinical diagnosis of cryptococcosis is based on culture and detection of a capsular antigen, with varied sensitivity and specificity (39, 40). However, molecular methods based on PCR and new technologies for antigen detection also have been described in recent years, although validation of these methods is pending (41–44).

Fungal pneumonias are clinically and radiologically similar to each other, and definitive diagnosis must be reached to initiate the appropriate therapy (45). Moreover, multiplex real-time PCR (Mrt-PCR) protocols allow the detection of mixed infections that cannot be detected by routine protocols. Mixed infections involving *H. capsulatum*, *C. neoformans*, and *P. jirovecii* have been described (46–48).

The aim of this study was the development of a Mrt-PCR for the early detection of fungal opportunistic pneumonia due to *H. capsulatum*, *C. neoformans*, *C. gattii*, and *P. jirovecii* in clinical samples from HIV-positive patients.

MATERIALS AND METHODS

Control strains and plasmids. DNA from different strains was used to standardize the Mrt-PCR assay. All the strains belonged to the Collection of the Mycology Reference Laboratory, Spanish National Center of Microbiology. To standardize the technique, we used the strains *C. neoformans* var. *neoformans* CNM-CL 2132, *H. capsulatum* CNM-CM 2721, and a plasmid that included the sequence target of *P. jirovecii* (pSG1).

To assess the specificity of the technique, the following strains of yeast and molds were used: *Candida albicans* (CNM-CL 5719), *Candida parapsilosis* (CNM-CL5683), *Candida tropicalis* (CNM-CL 5742), *Candida glabrata* (CNM-CL 5533), *Candida guilliermondii* (CNM-CL 7127), *Candida krusei* (CNM-CL 7057), *Coccidioides posadasii* (CNM-CM 2912), *Paracoccidioides brasiliensis* (CNM-CM 2908), *Aspergillus fumigatus* (CNM-CM AF237), *Aspergillus terreus* (CNM-CM 3508), *Aspergillus flavus* (CNM-CM 3509), *Aspergillus niger* (CNM-CM 3551), *Fusarium verticillioides* (CNM-CM 2975), *Fusarium oxysporum* (CNM-CM 2914), *Fusarium solani* (CNM-CM 3035), *Scedosporium prolificans* (CNM-CM1627), *Scedosporium apiospermum* (CNM-CM 3169), *Rhizopus oryzae* (CNM-CM 3020), and *Rhizopus microsporum* (CNM-CM 4244), *Mucor circinelloides* (CNM-CM 2437). In addition, we employed mouse genomic

TABLE 1 Sequences of primers and probes designed for the multiplex real-time PCR assay

Species and its primers and probe	Sequence ^a
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	
OliPJMB1 (f)	5'-CCCTAGTGTTTTAGCATTTC-3'
OLIPJMB2 (r)	5'-CTGCAATTCACACTACTTATCG-3'
Probe PJ-MB1	5'-HEX-CGCGATACCTTTGGCGAGGCAAGCAAATCGCG-BHQ1-3'
<i>Histoplasma capsulatum</i> ^b	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	
OLI CRYPTO 1 2 (f)	5'-CCTGTTGGACTTGGATTGG-3'
OLI CRYPTO 2 (r)	5'-AGCAAGCCGAAGACTACC-3'
Probe MB CRYPTO	5'-Cyan 500-CGCGATCATTACGCCGGGCTGACAGGTAATCAGATCGCG-BHQ1-3'
Jellyfish (internal control)	
Oli1-icjfl1 (f)	5'-GCCTGGTGCAAAAATTGCTTATC-3'
Oli1-icjfl2 (r)	5'-CTAAGACAAGTGTGTTTATGGTATTG-3'
Probe CIJF-MB	5'-Cy5-CGCGATGCTGTTCTCCGCCACTCCAATCGCG-BHQ2-3'

^a BHQ1, black hole quencher 1.

^b Sequences for the primers and probe for *H. capsulatum* are included in patent PCT/ES2009070340.

DNA (Promega, Madrid, Spain) and human genomic DNA (Promega, Madrid, Spain).

Design of primers and probes. Primers and molecular beacon probes were designed to specifically amplify a region of the ITS of the rDNA from *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii*, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *H. capsulatum* var. *duboisii*, and *Pneumocystis jirovecii* by Mrt-PCR. Beacon Designer 5.0 software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA) was used for primer and probe design. An internal control was included, as described previously (49). The primers and probes designed were subjected to a BLAST search within the GenBank sequence database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and in the database of the Department of Mycology of the Spanish National Center for Microbiology (which contains more than 8,000 distinct sequences), to avoid cross-homology with other microorganisms. The primer and probe sequences are shown in Table 1.

Multiplex real-time PCR assay. The amplification was carried out in a LightCycler 480 system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). PCRs were performed in a 20- μ l final volume containing 2 \times SensiMix DNA (Quantance; Ecogen, Madrid, Spain) used according to the manufacturer's instructions, 0.5 μ M each primer for each one of the species, 0.25 μ M internal control primer, 0.2 μ M each species-specific probe, 0.1 μ M internal control probe, 2 fg of the internal control plasmid (pICJF), and 2 μ l of DNA extracted from the sample, used as the template. The PCR conditions were as follows: an initial step of 95°C for 10 min, followed by 50 cycles of 95°C for 25 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 5 s, with a cooling cycle at 40°C for 30 s. Results were considered positive when the product amount increased until its fluorescence intensity exceeded the background, as determined by second-derivate analysis; these results were expressed in terms of the quantification cycle (C_q). Each experiment was performed in duplicate and included quantification standards as well as negative controls. Subsequently, a color compensation experiment was performed to prevent cross talk between dyes.

Standardization. Standard curves for *H. capsulatum* and *C. neoformans* were constructed based on the results of five PCR repetitions with dilutions of genomic DNA ranging from 20 ng to 2 fg/20 μ l of reaction mixture. The strains CNM-CL 2132 and CNM-CM 2721 were used to construct the standard curves. For *P. jirovecii*, a fragment of 175 bp con-

taining the ITS1 target region was cloned into a pGEMT-Easy plasmid (Promega, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. A 10-fold serial dilution of the plasmid clone (pSG1), from 20 ng ($2.92 \times 10^8 \log_{10}$ copies/20- μ l reaction mixture) to 2 fg of pDNA/20- μ l reaction mixture ($2.92 \log_{10}$ copies/20- μ l reaction mixture), was used to construct the standard curve. C_q values for each dilution series were determined in duplicate in three different experiments.

Regression lines were constructed by plotting the logarithm of the initial template concentration versus the corresponding C_q value. If this line exhibited a linear regression coefficient value of >0.980 , the standard curve was then used to determine the sensitivity, primer efficiencies, and reproducibility of the assay. In order to evaluate the specificity, 2 ng of DNA/20 μ l of reaction mixture from each of the other mold and yeast species, as well as human and mouse genomic DNA, was included in the PCR assay (control strains).

DNA extraction. DNA extraction from cultures of *H. capsulatum* was performed under biosafety level 3 conditions in compliance with Spanish law (Real decreto 664/1997) and following the method described by Buitrago et al. (23). DNA extraction from *C. neoformans* was performed as previously described by Tang et al. (50). Finally, genomic DNA of *P. jirovecii* was extracted from bronchoalveolar lavage (BAL) samples from 16 patients with proven *P. jirovecii* pneumonia. DNA extraction was performed following the recommendations from reference 15 with modifications. For that purpose, 1.5 ml of BAL fluid was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, the supernatant was discharged, and then the pellet was diluted in 200 μ l of supernatant. After that, DNA was extracted using a Qiamp DNA minikit (Qiagen) according to manufacturer's instructions in a 50- μ l elution volume. Two microliters of this DNA was used for the Mrt-PCR assays. DNA extractions from other specimens were also performed by using the Qiamp DNA minikit, without modifications. DNAs from paraffin-embedded tissues were isolated as described previously (51).

The DNA extraction efficiency was also determined. For that purpose, 5 μ l of the plasmid clone or genomic DNA, containing from 10 ng to 1 fg, was added to 200 μ l of serum from healthy patients. Then, DNA extraction was performed by using the Qiamp DNA minikit (Qiagen), and 2 μ l was used for the Mrt-PCR protocol. The percentage of DNA recovered was determined for each of the dilutions. The experiments were run in triplicate.

Multiplex real-time assay of cultured clinical strains. The Mrt-PCR assay was initially validated by using cultures from 13 clinical strains of *Cryptococcus* spp. complex (*C. neoformans* var. *neoformans* [$n = 3$], *C. neoformans* var. *grubii* [$n = 3$], *C. gattii* [$n = 4$], and hybrids [$n = 3$]) and 10 *H. capsulatum* strains belonging to the Mold Collection of the Mycology Department of the National Center for Microbiology. All the strains included in the study were previously identified by sequencing the ITS region from the rDNA (52). For *P. jirovecii* validation, clones from 4 different BAL samples were evaluated in triplicate. Two microliters of the extracted DNA was employed to perform the Mrt-PCR assay.

Mrt-PCR assay of clinical samples. The utility of the Mrt-PCR was also evaluated by using clinical samples. Forty-three clinical specimens from 40 HIV-positive patients with proven infection (according to the EORTC/MSG criteria) were evaluated by Mrt-PCR. Because the EORTC/MSG criteria do not include infection caused by *Pneumocystis jirovecii*, proven PCP was considered when the fungus was visualized by methenamine silver stain and the patient showed clinical signs of pneumonia. Patients and clinical specimens are summarized in Table 2. Two microliters of DNA from each sample was used for the Mrt-PCR.

Twenty-nine specimens from the following groups of patients were included to assess the specificity of the technique: HIV⁺ patients from areas where histoplasmosis is endemic, HIV⁺ patients from areas of endemicity and with viral or bacterial pneumonia, and HIV⁺ patients with invasive fungal infection (IFI) caused by other fungal species; patients with IFI and other underlying diseases were included as negative controls (Table 3).

RESULTS

Assay standardization in vitro. The Mrt-PCR assay developed was able to reliably detect *C. neoformans*, *H. capsulatum*, and *P. jirovecii* DNA. The sizes of the amplicons generated were 175 bp for *P. jirovecii*, 106 bp for *H. capsulatum*, and 139 bp for *C. neoformans*.

No cross-reactivity to other fungi or either human or mouse DNA was detected (control materials). In addition, no cross-reactivity between them was observed. The detection limits of the assay were 2 and 20 fg of genomic DNA per 20 μ l of PCR mixture for *C. neoformans* and *H. capsulatum*, respectively, and $2.69 \log_{10}$ copies/20 μ l of reaction mixture for *P. jirovecii* (Fig. 1). Quantification was linear for all the fungal species included in the assay, and the standard curve generated showed a high coefficient of determination ($R^2 = 0.98$ to 0.99). The average coefficient of variation was 2.18% for *H. capsulatum* DNA, 3.93% for *C. neoformans* DNA, and 3.35% for 2 replicates from two different plasmids of *P. jirovecii* (Table 4). Each of the species was detected in their corresponding fluorophore channels (Fig. 2). The mean crossing point (C_p) value for the internal control was 33 ± 0.6 . The calculated average DNA extraction efficiencies from clinical samples were 79.8%, 78%, and 96.5% for *H. capsulatum*, *C. neoformans*, and *P. jirovecii*, respectively.

Results with clinical cultured strains. Results were positive for all clinical isolates tested. For the four *P. jirovecii* clones, the mean (\pm standard deviation) C_q obtained was 14.03 ± 0.71 ; the mean C_q was 26.27 ± 2.04 for all the clinical strains of *H. capsulatum* and 20.47 ± 1.34 for the *C. neoformans/C. gattii* isolates. No differences among C_q values for the different *Cryptococcus* spp. were detected.

Results with clinical samples. A total of 43 clinical samples from 40 patients with HIV as the underlying disease were analyzed by Mrt-PCR. The source of the clinical samples was very heterogeneous (Table 2). Our Mrt-PCR assay was positive for 37/40 patients (92.5% sensitivity) and 39/43 clinical samples (90.7% sensitivity); the estimated clinical specificity was 100% for both analyses. The assay was negative in 3 cases: in 2 patients diagnosed with histoplasmosis and in 1 patient diagnosed with cryptococcosis. All patients with proven PCP showed a positive Mrt-PCR result. All the samples from patients included as controls showed negative PCR results. The average amount of DNA in each of the clinical samples is shown in Table 2. No inhibition of the PCR was detected with any of the clinical samples tested.

Although proven histoplasmosis was demonstrated by Mrt-PCR for case number 3, *P. jirovecii* infection was also detected (Fig. 1). Results were verified by sequencing the PCR products.

DISCUSSION

Opportunistic fungal pneumonias are one of the most frequent pulmonary complications in HIV-positive patients (4). In this study, we evaluated the utility of a single-tube Mrt-PCR assay for the diagnosis and identification of four of the most frequent causes of opportunistic fungal pneumonia in AIDS patients. Clinical symptomatology of these infections is based on the observation of abnormalities in chest X-rays, but in patients with proven or suspected HIV infection such findings are also related to *Mycobacterium tuberculosis* infection (45). Therefore, tuberculosis could overshadow other opportunistic infections, such as crypto-

TABLE 2 Mrt-PCR results for clinical samples from patients with proven opportunistic fungal pneumonia

Patient no.	Proven infection	Sample	PCR result	C_p (s)	Amt of DNA ^c
1	Histoplasmosis	BAL	Positive	27.54	7×10^{-3}
2	Histoplasmosis	Bone marrow	Negative		
		Blood	Positive	29.46	1×10^{-3} , 8×10^{-3}
3 ^a	Histoplasmosis	Bronchiaspirate	Positive	29.18, 28.8 ^b	2.2×10^{-3} , 3.37 log ₁₀
4	Histoplasmosis	Bone marrow	Positive	29.33	1.9×10^{-3}
		Serum	Negative		
5	Histoplasmosis	Blood	Positive	29.53	1.7×10^{-3}
		BAL	Positive	29	2.5×10^{-3}
6	Histoplasmosis	Biopsy	Positive	27.2	8.9×10^{-3}
7	Histoplasmosis	Biopsy	Positive	29.3	2×10^{-3}
8	Cryptococcosis	Blood	Positive	40.97	2.5×10^{-3}
9	Cryptococcosis	Biopsy	Negative		
10	PCP	BAL	Positive	27.5	5×10^2 log ₁₀
11	PCP	BAL	Positive	36.75	1.42 log ₁₀
12	PCP	BAL	Positive	29.93	1×10^2 log ₁₀
13	PCP	BAL	Positive	27.7	4.4×10^2 log ₁₀
14	PCP	BAL	Positive	27.51	5×10^2 log ₁₀
15	PCP	BAL	Positive	25.61	1.7×10^3 log ₁₀
16	PCP	BAL	Positive	33.28	12 log ₁₀
17	PCP	BAL	Positive	33.05	14 log ₁₀
18	PCP	BAL	Positive	32.92	16 log ₁₀
19	PCP	BAL	Positive	33.16	13 log ₁₀
20	PCP	BAL	Positive	33.15	14 log ₁₀
21	PCP	BAL	Positive	33.83	9 log ₁₀
22	PCP	BAL	Positive	33.57	10 log ₁₀
23	PCP	BAL	Positive	33.37	12 log ₁₀
24	PCP	BAL	Positive	32.44	22 log ₁₀
25	PCP	BAL	Positive	33.22	13 log ₁₀
26	Cryptococcosis	BAL	Positive	28.12	8.6×10^{-3}
27	Cryptococcosis	BAL	Positive	28.94	5.1×10^{-3}
28	Histoplasmosis	Biopsy	Positive	19.35	2.1×10^{-3}
29	Histoplasmosis	Biopsy	Positive	27.14	9.3×10^{-3}
30	Histoplasmosis	Sputum	Positive	25.46	3×10^{-2}
31	Histoplasmosis	Sputum	Positive	26.45	1.5×10^{-2}
32	Histoplasmosis	Sputum	Positive	26.79	1.1×10^{-2}
33	Histoplasmosis	Serum	Positive	26.97	1×10^{-2}
34	Histoplasmosis	Bone marrow	Negative		
35	Cryptococcosis	BAL	Positive	26.9	1.8×10^{-2}
36	PCP	BAL	Positive	28.02	3.65×10^2 log ₁₀
37	PCP	BAL	Positive	27.69	4.50×10^2 log ₁₀
38	PCP	BAL	Positive	27.26	5.9×10^2 log ₁₀
39	PCP	BAL	Positive	25.28	2×10^3 log ₁₀
40	PCP	BAL	Positive	26.7	8.410×10^2 log ₁₀

^a Patient number 3 showed a mixed infection with *Histoplasma capsulatum* and *Pneumocystis jirovecii*.

^b The first and second C_p s correspond to *H. capsulatum* and *P. jirovecii*, respectively.

^c Values shown are in ng/μl except where specified as "log₁₀," indicating log₁₀ numbers of copies/μl.

coccosis and pulmonary histoplasmosis, delaying the diagnosis and correct treatment (53).

Molecular techniques have been proven to be very useful for the diagnosis of fungal infections (54). However, reports describing Mrt-PCR approaches for the diagnosis of opportunistic pneumonias are scarce (55). In fact, this is the first report to describe an Mrt-PCR assay for the simultaneous detection of *P. jirovecii*, *H. capsulatum*, and *C. neoformans*.

Our assay proved to be species specific (100%), with high reproducibility ($r^2 > 0.98$) and sensitivity (100%) for each of the species. The Mrt-PCR was also validated by using clinical samples

from 40 patients with proven infection diagnosed using classical techniques. Although respiratory samples (bronchoalveolar lavage fluid, pulmonary biopsy tissue, sputum, or pleural fluid) are the most appropriate samples for the diagnosis of opportunistic pneumonias, in patients with advanced immunosuppression systemic infection may develop, and other samples, such as blood, serum, or bone marrow biopsy specimens can be used for definitive diagnosis. Our assay was able to detect 92.5% of the infections in patients with proven infection. The Mrt-PCR yielded a negative result for four clinical samples (from serum, bone marrow, and biopsy) for three patients. These negative clinical samples were

TABLE 3 Summary of control populations used to determine background colonization levels and the specificity of the Mrt-PCR assay

Population	Control sample no.	Specimen	PCR result	Species causing IFI
HIV ⁺ patients from areas of endemicity	1	Bone marrow	Negative	
	2	Biopsy	Negative	
	3	Biopsy	Negative	
	4	Bone marrow	Negative	
	5	Whole Blood	Negative	
	6	Whole Blood	Negative	
HIV ⁺ patients from areas of endemicity and with viral or bacterial pneumonia	7	BAL	Negative	
	8	BAL	Negative	
	9	BAL	Negative	
	10	Biopsy	Negative	
HIV ⁺ patients with invasive fungal infection caused by other fungal species	11	Biopsy	Negative	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
	12	Biopsy	Negative	<i>Rhizomucor pusillus</i>
	13	BAL	Negative	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	14	BAL	Negative	<i>Cryptococcus humicola</i>
	15	BAL	Negative	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium</i> spp., and <i>Cryptococcus albidus</i>
Non-HIV-infected patients with invasive fungal infection	16	Biopsy	Negative	<i>Coccidioides immitis</i>
	17	Biopsy	Negative	<i>Scedosporium apiospermum</i>
	18	Biopsy	Negative	<i>Bipolaris</i> spp.
	19	BAL	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	20	BAL	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	21	BAL	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	22	BAL	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	23	BAL	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	24	Ascitic fluid	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	25	Cerebrospinal fluid	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	26	BAL	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	27	Biopsy	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	28	Biopsy	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	29	BAL	Negative	<i>Aspergillus fumigatus</i>

stored for more than 5 years at -20°C , which may have decreased the sensitivity of the assay (56).

Interestingly, for one of the patients diagnosed with histoplasmosis, *P. jirovecii* DNA was detected. In fact, coinfections may occur, and accurate diagnosis and prompt appropriate antifungal treatment are required. Several reports of cases of mixed infections have been published, and for all of them the definitive diagnosis was based on microbiological evidence. Bava et al. (47) reported a case in which a patient had mixed infection due to *Cryptococcus* and *Pneumocystis*. Mixed infections of *H. capsulatum* and *C. neoformans* (46), as well as of *P. jirovecii* and *H. capsulatum*, have also been reported in individuals from areas (48). Finally, coinfection with *H. capsulatum* and *M. tuberculosis* is frequent in some areas where histoplasmosis is endemic and may involve important implications for treatment (57).

To our knowledge, only one PCR-based protocol has been previously reported for the detection of tuberculosis and PCP in HIV-infected patients (55). rt-PCR approaches for the detection of *C. neoformans*/*C. gattii*, *H. capsulatum*, and *P. jirovecii* separately have been widely described based on the amplification of different targets, with varied sensitivity and specificity. Most of the rt-PCR approaches for the diagnosis of cryptococcosis are based on the amplification of monocopy genes (43, 58), which may decrease the sensitivity of the technique. Our technique allows detection of

both *C. neoformans* spp. complex and *C. gattii*, but it cannot differentiate species. Although the identification at species level is important for epidemiological studies, clinical signs and treatment are similar for infections caused by either species (59–61). Moreover, a majority of the real-time protocols for the detection of PCP are based on nested PCR, which may decrease the specificity of the technique due to the possibility of false-positive results (58). Although there are several articles describing rt-PCR assays for the detection of *H. capsulatum* based on the amplification of multi-copy regions, such as ITS, the use of molecular beacon probes can improve the sensitivity of the technique due to their small size and sequence specificity (23). The technique we have described in this article can detect several fungi in a single-tube reaction. The limit to detection of more fungal species is determined by the real-time PCR equipment.

In conclusion, this is the first report to describe an Mrt-PCR for the diagnosis of opportunistic fungal pneumonias. This approach could be very useful for differential diagnosis with tuberculosis, as clinical signs are similar, and also to detect mixed infections that could appear in patients with advanced immunosuppression living in areas of endemicity. Moreover, this assay could be useful for the clinical management of other immunocompromised patients at risk for these fungal infections (e.g., patients under corticosteroid therapy or chemo-

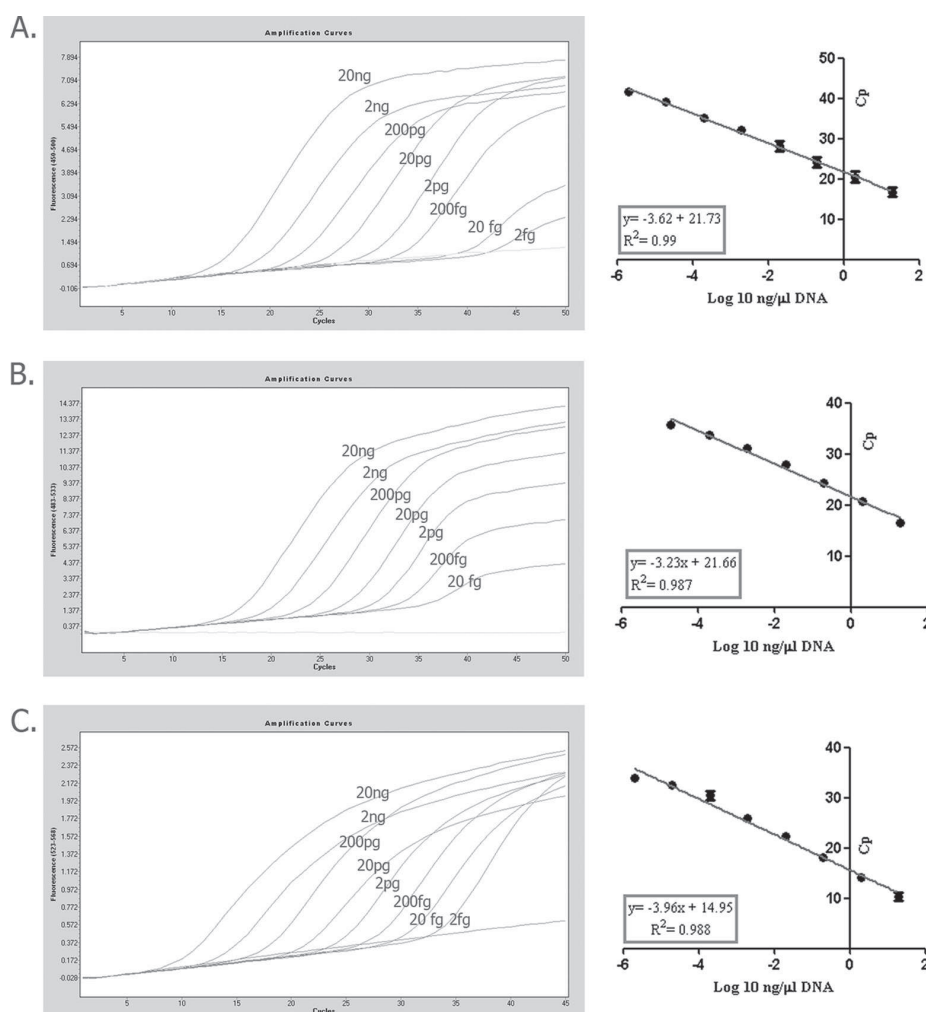


FIG 1 Quantification standard curve obtained by using serial 1:10 dilutions of different concentrations of DNA from *Pneumocystis jirovecii* (A), *Histoplasma capsulatum* (B), and *Cryptococcus neoformans* (C). Error bars represent the percent coefficient of variation. Standard curves were constructed after a color compensation experiment.

therapy or those treated with tumor necrosis factor). Although Mrt-PCR assays are more expensive than conventional approaches (the approximate cost is around 100 € per PCR determination), they provide a fast and specific diagnosis, as they

allow the detection of mixed infection and avoid delays in appropriate antifungal therapy. Moreover, our Mrt-PCR could be implemented in clinical settings in developing countries and in countries that receive immigrant populations from those re-

TABLE 4 Overview of standardization of the Mrt-PCR assay with serial dilutions of a plasmid clone containing the target for *P. jirovecii* or with genomic DNA of *Histoplasma capsulatum* or *Cryptococcus neoformans*

Amt of DNA/μl	<i>H. capsulatum</i>			<i>C. neoformans</i>			<i>P. jirovecii</i>		
	Cq	SD	%CV	Cq	SD	%CV	Cq	SD	%CV
10 ng	16.53	0.52	3.15	16.78	1.17	6.97	10.26	0.803	7.834
1 ng	20.656	0.50	2.46	20.494	1.36	6.64	14.205	0.716	5.047
100 pg	24.304	0.59	2.43	24.128	1.21	5.02	18.055	0.733	4.06
10 pg	27.986	0.66	2.36	28.172	1.27	4.53	22.3075	0.769	3.450
1 pg	31.158	0.51	1.66	32.156	0.93	2.89	25.87	0.222	0.858
100 fg	33.758	0.48	1.43	35.058	0.96	2.74	30.4925	0.921	3.022
10 fg	35.644	0.29	0.83	39.1	0.88	2.25	32.47	0.621	1.914
1 fg	16.53	0.52	3.15	41.76	0.16	0.38	Negative	Negative	Negative

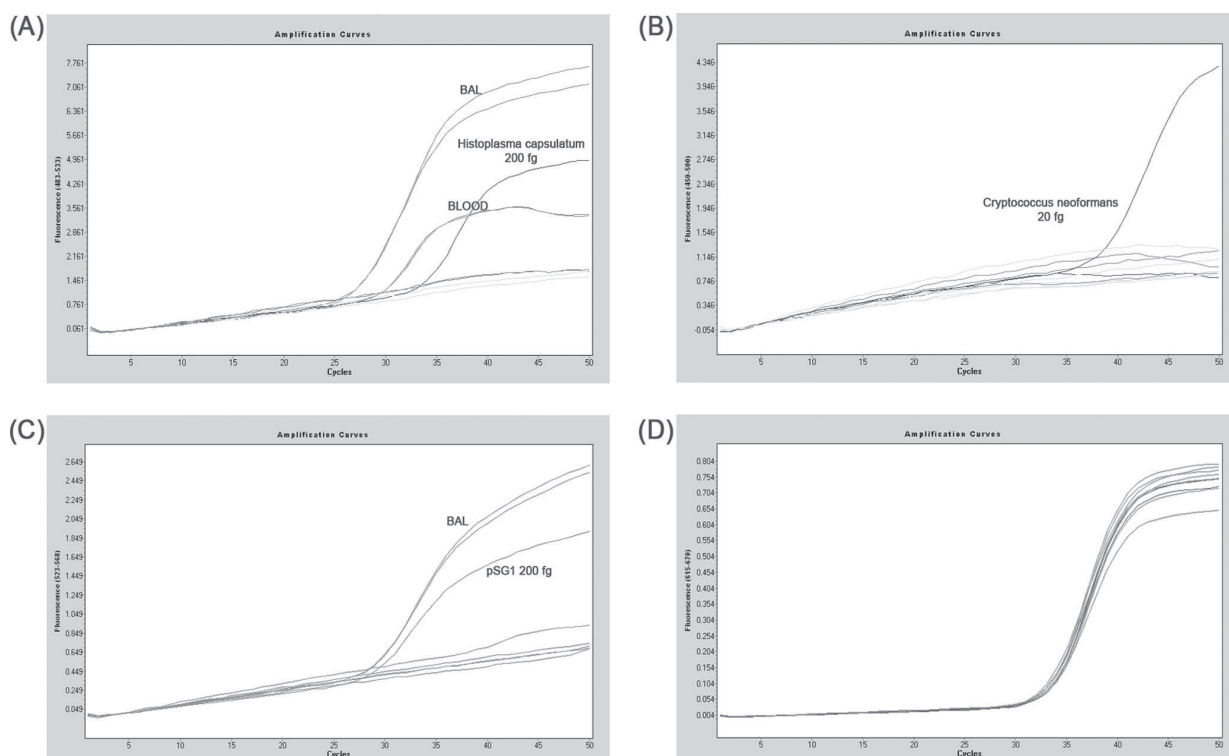


FIG 2 Dependence of fluorescence signal on the number of cycles in the multiplex real-time PCR assay for the patient with mixed infection. (A) Fluorescence detection in the 6-carboxyfluorescein (FAM) fluorescence channel, based on positive signal for the *Histoplasma capsulatum* molecular beacon probe. (B) Fluorescence detection in the Cyan 500 fluorescence channel. The positive signal is for the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* molecular beacon probe. (C) Fluorescence detection in the 6-carboxy-hexachlorofluorescein (HEX) fluorescence channel. The positive signal is for the *Pneumocystis jirovecii* molecular beacon probe. (D) Fluorescence detection of Cy5 dye as end label to the specific pICJP molecular beacon probe.

gions. Further studies with a larger number of samples are warranted.

ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Frank Hodkings for his careful reading and editing of the manuscript.

This work was supported by research project PI11/00412 from Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Instituto de Salud Carlos III. S.G. and C.V. are supported by research fellowships from the Fondo de Investigaciones Biomédicas of the Spanish Ministry of Science and Innovation (FI10/00464 and FI12/00095, respectively).

We declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Huang L, Cattamanchi A, Davis JL, den Boon S, Kovacs J, Meshnick S, Miller RF, Walzer PD, Wordria W, Masur H, International HIV-Associated Opportunistic Pneumonias (IHOP) Study, Lung HIV Study. 2011. HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia. Proc. Am. Thorac Soc. 8:294–300. <http://dx.doi.org/10.1513/pats.201009-062WR>.
- Gingo MR, Balasubramani GK, Kingsley L, Rinaldo CR, Jr, Alden CB, Detels R, Greenblatt RM, Hessel NA, Holman S, Huang L, Kleerup EC, Phair J, Sutton SH, Seaberg EC, Margolick JB, Wisniewski SR, Morris A. 2013. The impact of HAART on the respiratory complications of HIV infection: longitudinal trends in the MACS and WIHS cohorts. PLoS One 8(3):e58812. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058812>.
- Rosen MJ. 1992. Pulmonary complications of HIV infection. Mt. Sinai J. Med. 59:263–270.
- Rosen MJ. 1994. Pneumonia in patients with HIV infection. Med. Clin. North Am. 78:1067–1079.
- Rosen MJ. 2008. Pulmonary complications of HIV infection. Respirology 13:181–190. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2007.01167.x>.
- Schneider E, Whitmore S, Glynn KM, Dominguez K, Mitsch A, McKenna MT, Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years—United States, 2008. MMWR Recomm. Rep. 57(RR-10):1–12.
- Hay JW, Osmond DH, Jacobson MA. 1988. Projecting the medical costs of AIDS and ARC in the United States. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1:466–485.
- McKinnell JA, Cannella AP, Kunz DF, Hook EW, III, Moser SA, Miller LG, Baddley JW, Pappas PG. 2012. *Pneumocystis* pneumonia in hospitalized patients: a detailed examination of symptoms, management, and outcomes in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and HIV-uninfected persons. Transpl. Infect. Dis. 14:510–518. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1339-3062.2012.00739.x>.
- Calderon EJ, Gutierrez-Rivero S, Durand-Joly I, Dei-Cas E. 2010. *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 8:683–701. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.10.42>.
- Carmona EM, Limper AH. 2011. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. Ther. Adv. Respir. Dis. 5:41–59. <http://dx.doi.org/10.1177/1753465810380102>.
- Summah H, Zhu YG, Falagas ME, Vouloumanou EK, Qu JM. 2013. Use of real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients: a meta-analysis. Chin. Med. J. 126:1965–1973. <http://dx.doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20122506>.
- Tasaka S, Tokuda H. 2013. Recent advances in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected adults. Expert Opin. Med. Diagn. 7:85–97. <http://dx.doi.org/10.1517/17530059.2012.722080>.

13. Fillaux J, Berry A. 2013. Real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Methods Mol. Biol.* 943:159–170. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-4_11.
14. Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, Linas MD, Berry A. 2008. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J. Microbiol. Methods* 75: 258–261. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.06.009>.
15. Botterel F, Cabaret O, Foulet F, Cordonnier C, Costa JM, Bretagne S. 2012. Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* 50:227–231. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06036-1>.
16. van Oosterhout JJ, Laufer MK, Perez MA, Graham SM, Chimbiya N, Thesing PC, Alvarez-Martinez MJ, Wilson PE, Chagomerana M, Zijlstra EE, Taylor TE, Plowe CV, Meshnick SR. 2007. *Pneumocystis* pneumonia in HIV-positive adults, Malawi. *Emerg. Infect. Dis.* 13:325–328. <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/2/06-0462/htm>.
17. Dalpke AH, Hofko M, Zimmermann S. 2013. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* on the fully automated BD MAX platform. *J. Clin. Microbiol.* 51:2337–2343. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00616-13>.
18. Orsi CF, Gennari W, Venturelli C, La Regina A, Pecorari M, Righi E, Machetti M, Blasi E. 2012. Performance of 2 commercial real-time polymerase chain reaction assays for the detection of *Aspergillus* and *Pneumocystis* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from critical care patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73:138–143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.03.001>.
19. Asai N, Motojima S, Ohkuni Y, Matsunuma R, Nakashima K, Iwasaki T, Nakashita T, Otsuka Y, Kaneko N. 2012. Early diagnosis and treatment are crucial for the survival of *Pneumocystis* pneumonia patients without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Chemother.* 18:898–905. <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-012-0441-4>.
20. Hernandez SL, Lopez De Blanc SA, Sambuelli RH, Roland H, Cornelli C, Lattanzi V, Carnelli MA. 2004. Oral histoplasmosis associated with HIV infection: a comparative study. *J. Oral Pathol. Med.* 33:445–450. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2004.00200.x-ii>.
21. Huber F, Nacher M, Aznar C, Pierre-Demar M, El Guedj M, Vaz T, Vantilcke V, Mahamat A, Magnien C, Chauvet E, Carme B, Couppie P. 2008. AIDS-related *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* infection: 25 years experience of French Guiana. *AIDS* 22:1047–1053. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282ffde67>.
22. Couppie P, Aznar C, Carme B, Nacher M. 2006. American histoplasmosis in developing countries with a special focus on patients with HIV: diagnosis, treatment, and prognosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:443–449. <http://dx.doi.org/10.1097/01.qco.0000244049.15888.b9>.
23. Buitrago MJ, Canteros CE, Frias De Leon G, Gonzalez A, Marques-Evangelista De Oliveira M, Munoz CO, Ramirez JA, Toranzo AI, Zancope-Oliveira R, Cuenca-Estrella M. 2013. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev. Iberoam. Micol.* 30:256–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.03.004>.
24. Buitrago MJ, Cuenca-Estrella M. 2012. Current epidemiology and laboratory diagnosis of endemic mycoses in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 30:407–413. (In Spanish.) <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.014>.
25. Deepe GS. 2000. *Histoplasma capsulatum*, p 2718–2733. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed), *Principles and practice of infectious diseases*, 7th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.
26. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE, Kauffman CA, Infectious Diseases Society of America. 2007. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 45:807–825. <http://dx.doi.org/10.1086/521259>.
27. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, Hohle R. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1644–1647. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.5.1644-1647.2002>.
28. Bialek R, Ernst F, Dietz K, Najvar LK, Knobloch J, Graybill JR, Schaumburg-Lever G. 2002. Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections. *Am. J. Clin. Pathol.* 117:597–603.
29. Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, Lodge BA, Reller LB, Procop GW. 2003. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41:1295–1298. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.3.1295-1298.2003>.
30. Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2006. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:665–668. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-006-0207-y>.
31. Porta A, Colonna-Romano S, Callebaut I, Franco A, Marzullo L, Kobayashi GS, Maresca B. 1999. An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254:605–613.
32. Frias De Leon MG, Arenas Lopez G, Taylor ML, Acosta Altamirano G, Reyes-Montes Mdel R. 2012. Development of specific sequence-characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* 50:673–679. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05271-11>.
33. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govenor N, Pappas PG, Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23:525–530. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e328322ffac>.
34. Byrnes EJ, Heitman J. 2009. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biol. Rep.* 1:pii. <http://dx.doi.org/10.3410/B1-62>.
35. Fyfe M, MacDougall L, Romney M, Starr M, Pearce M, Mak S, Mithani S, Kibsey P. 2008. *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. *Can. Commun. Dis. Rep.* 34:1–12.
36. Marr KA. 2012. *Cryptococcus gattii* as an important fungal pathogen of western North America. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10:637–643. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.12.48>.
37. Govenor NP, Patel J, van Wyk M, Chiller TM, Lockhart SR, Group for Enteric, Respiratory and Meningeal Disease Surveillance in South Africa (GERMS-SA). 2011. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population-based surveillance in South Africa in 2002–2003 and 2007–2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2606–2611. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00048-11>.
38. Lortholary O, Sibton K, Dromer F, French Cryptococcosis Study G. 2005. Evidence for human immunodeficiency virus and *Cryptococcus neoformans* interactions in the pro-inflammatory and anti-inflammatory responses in blood during AIDS-associated cryptococcosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:296–300. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01074.x>.
39. Liechty CA, Solberg P, Were W, Ekwaru JP, Ransom RL, Weidle PJ, Downing R, Coutinho A, Mermin J. 2007. Asymptomatic serum cryptococcal antigenemia and early mortality during antiretroviral therapy in rural Uganda. *Trop. Med. Int. Health* 12:929–935. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01874.x>.
40. Jarvis JN, Percival A, Bauman S, Pelfrey J, Meintjes G, Williams GN, Longley N, Harrison TS, Kozel TR. 2011. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin. Infect. Dis.* 53: 1019–1023. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir613>.
41. Carvalho VG, Terceti MS, Dias AL, Paula CR, Lyon JP, de Siqueira AM, Franco MC. 2007. Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 49:207–210. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652007000400002>.
42. Diaz MR, Fell JW. 2005. Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *J. Clin. Microbiol.* 43:3662–3672. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.8.3662-3672.2005>.
43. Veron V, Simon S, Blanchet D, Aznar C. 2009. Real-time polymerase chain reaction detection of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in human samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65:69–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.05.005>.
44. Hansen J, Slechta ES, Gates-Hollingsworth MA, Neary B, Barker AP, Bauman S, Kozel TR, Hanson KE. 2013. Large-scale evaluation of the immuno-mycology lateral flow and enzyme-linked immunoassays for detection of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid. *Clin. Vaccine Immunol.* 20:52–55. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00536-12>.
45. Reynolds JH, Banerjee AK. 2012. Imaging pneumonia in immunocompetent and immunocompromised individuals. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 18:194–201. <http://dx.doi.org/10.1097/MCP.0b013e328351f953>.
46. Aronis ML, dos Santos RP, Goldani LZ. 2011. Disseminated *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* co-infection in patients with

Gago et al.

- AIDS. Mycopathologia 172:233–236. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-011-9422-x>.
47. Javier B, Susana L, Santiago G, Alcides T. 2012. Pulmonary coinfection by *Pneumocystis jirovecii* and *Cryptococcus neoformans*. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2:80–82. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60195-0](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60195-0).
 48. Tschudy J, Michail S. 2010. Disseminated histoplasmosis and pneumocystis pneumonia in a child with Crohn disease receiving infliximab. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 51:221–222. <http://dx.doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181c2c10d>.
 49. Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2013. Development of a single tube multiplex real-time PCR to detect the most clinically relevant Mucormycetes species. Clin. Microbiol. Infect. 19:E1–E7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03976.x>.
 50. Tang CM, Cohen J, Krausz T, Van Noorden S, Holden DW. 1993. The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. Infect. Immun. 61:1650–1656.
 51. Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, Bernal-Martinez L, Prieto M, Garcia-Reyne A, Garcia-Rodriguez J, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2013. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. Clin. Microbiol. Infect. 19:E271–277. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12110>.
 52. White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor J. 2011. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics, p 315–324. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA.
 53. Kyeyune R, den Boon S, Cattamanchi A, Davis JL, Worodria W, Yoo SD, Huang L. 2010. Causes of early mortality in HIV-infected TB suspects in an East African referral hospital. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 55:446–450. <http://dx.doi.org/10.1097/qai.0b013e3181eb611a>.
 54. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Racil Z, Richardson M, Rogers TR. 2011. Detection and investigation of invasive mould disease. J. Antimicrob. Chemother. 66(Suppl. 1):i15–i24. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dpkq438>.
 55. Boondireke S, Mungthin M, Tan-ariya P, Boonyongsunchai P, Naaglor T, Wattanatham A, Treewatchareekorn S, Leelayoova S. 2010. Evaluation of sensitivity of multiplex PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Pneumocystis jirovecii* in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 48:3165–3168. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00323-10>.
 56. Lau A, Halliday C, Chen SC, Playford EG, Stanley K, Sorrell TC. 2010. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. J. Clin. Microbiol. 48:811–816. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01650-09>.
 57. Agudelo CA, Restrepo CA, Molina DA, Tobon AM, Kauffman CA, Murillo C, Restrepo A. 2012. Tuberculosis and histoplasmosis coinfection in AIDS patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 87:1094–1098. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0292>.
 58. Qishui O, Ling J, Ni L, Bin Y, Wen L. 2012. Comparison of real-time fluorescence quantitative PCR measurements of VAD1 mRNA with three conventional methods in diagnosis and follow-up treatment of *Cryptococcus neoformans* infection. Mycoses 55:326–332. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02100.x>.
 59. Antinori S. 2013. New insights into HIV/AIDS-associated cryptococcosis. ISRN AIDS 2013:471363. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/471363>.
 60. Bratton EW, El Husseini N, Chastain CA, Lee MS, Poole C, Sturmer T, Weber DJ, Juliano JJ, Perfect JR. 2013. Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. Antimicrob. Agents Chemother. 57:2485–2495. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01800-12>.
 61. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC. 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 50:291–322. <http://dx.doi.org/10.1086/649858>.

3.2. Desarrollo de una PCR cuantitativa en tiempo real para el diagnóstico de coccidioidomicosis

La dificultad del diagnóstico temprano de la coccidioidomicosis radica en que la mayoría de los síntomas son inespecíficos, la serología no indica infección aguda y el cultivo microbiológico es a menudo negativo. Por tanto es esencial el desarrollo de técnicas sensibles como la PCR cuantitativa. La metodología desarrollada se basa en el empleo de una sonda *molecular beacon* dirigida a la región ITS-1 del ADN ribosómico y que es específica para *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*. El ensayo presentó elevada sensibilidad (100%) y especificidad (100%) in vitro, y un límite de detección de 1 fg de ADN/ μ l. La validación del ensayo se realizó con muestras de tejido de un modelo murino de infección sistémica, muestras de pacientes y tejido parafinado de modelos animales de meningitis por *Coccidioides* spp.

El modelo murino de infección sistémica se realizó en dos experimentos independientes, los ratones CD-1 hembras se infectaron vía intravenosa con 250 arthroconidias de la cepa Silveira de *C. posadasii*. La carga fúngica se determinó en los días 5, 10 y 14 posteriores a la infección en hígado, pulmón y bazo. Para todos los días de muestreo, el número de ufc/ml obtenido fue 10-1000 veces mayor cuando la determinación se realizó mediante PCR en tiempo real que mediante recuento en placa. Sin embargo, ambos métodos evaluaron la progresión de la infección de forma similar ($p > 0.05$). Las muestras de sangre presentaron un resultado negativo en los días en los que se realizaron las determinaciones. El ensayo fue positivo para todas las muestras de tejidos procedentes de un modelo animal de meningitis por *Coccidioides* spp. así como en aquellos pacientes con infección probada.

Los resultados de este trabajo han demostrado el potencial de la PCR en tiempo real para el diagnóstico de coccidioidomicosis en muestras procedentes de animales y de pacientes enfermos. Además, este ensayo reduce el riesgo asociado al trabajo con patógenos de nivel de seguridad 3 y reduce el tiempo en el diagnóstico definitivo basado en cultivo.

ARTICLE IN PRESS

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xxx (2014) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobioDevelopment and validation of a quantitative real-time PCR assay for the early diagnosis of coccidioidomycosis[☆]Sara Gago^a, María José Buitrago^a, Karl V. Clemons^{b,c,d,*}, Manuel Cuenca-Estrella^a, Laurence F. Mirels^{b,c}, David A. Stevens^{b,c,d}^a Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^b California Institute for Medical Research, San Jose, CA, USA^c Department of Medicine, Santa Clara Valley Medical Center, San Jose, CA, USA^d Department of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2013

Received in revised form 27 January 2014

Accepted 30 January 2014

Available online xxx

Keywords:

Coccidioidomycosis

RT-PCR

Diagnosis

ABSTRACT

A new real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay based on a *Coccidioides* genus-specific molecular beacon probe was developed for the detection of coccidioidomycosis and validated with tissues from animal models and clinical samples. The assay showed high analytic reproducibility ($r^2 > 0.99$) and specificity for cultured strains (100%); the lower limit of detection was 1 fg of genomic DNA/ μ L of reaction. Fungal burdens in the organs of mice infected with *Coccidioides posadasii* strain Silveira were more accurately quantified by RT-PCR compared to colony-forming unit for all tissues. The RT-PCR assay was positive for 97.7% of spleen and 100% of liver or lung. Progression of infection in all organs was similar by both methods ($P > 0.05$). The sensitivity of the assay also was 100% for paraffin-embedded samples and samples from patients with positive cultures. Our RT-PCR assay is effective for the diagnosis and monitoring of *Coccidioides* infection, and its use also avoids the biohazard and time delay of identifying cultures in the clinical setting.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Coccidioidomycosis is endemic in the southwestern United States, as well as in Latin America (Laniado-Laborin, 2007; Pappagianis, 1993, 1994). This endemic mycosis is caused by 2 closely related species, *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*, which are described as Californian and non-Californian species, respectively. Differences in the manifestation of disease or the diagnosis of the infection have not been reported for these species (Fisher et al., 2002). Infection usually occurs after inhalation of arthroconidia and initiation of a respiratory infection. Predisposing factors for life-threatening infection include racial ethnicity, immunosuppression, and pregnancy (Pappagianis, 1988, 1993). Despite this, most infections are asymptomatic, while symptomatic presentation can be similar to community-acquired pneumonia. A minority of patients develop disseminated infection, which can present in a variety of tissues, such as skin lesions, osteomyelitis, or meningitis (Ampel, 2010). The incidence of coccidioidomycosis has increased in the last 10 years, which could be related to climatologic factors, soil

disturbance, or an influx of susceptible individuals to the endemic areas (CDC, 2013; Hector et al., 2011).

Although culture is the gold standard for definitive diagnosis of fungal infections, it often requires extended times of incubation (2–7 or more days) (Sutton, 2007). Moreover, for coccidioidomycosis sensitivity of culture is less than 50% (Saubolle, 2007) and even less than 1% for blood cultures (Saubolle et al., 2007). Although serological tests for the diagnosis of coccidioidomycosis are the most frequently used assays, serology can be falsely negative especially in immunocompromised hosts or early after infection. In addition, positive serological results may not always be indicative of active infection as antibodies can persist, even following appropriate therapy (Ampel, 2010; Crabtree et al., 2008; Durkin et al., 2009; Kuberski et al., 2010). Although histopathological studies can also be useful, fungal structures are often observed only when the infection is advanced (Cuenca-Estrella et al., 2011). *Coccidioides* has been included as a potential pathogen for bioterrorism, and handling this hazardous pathogen is limited to biosafety level 3 laboratories (Dixon, 2001). Thus, the development of new tools for early diagnosis and reducing the risk of working with cultures of *Coccidioides* are needed.

Molecular methods for the diagnosis of fungal infections may be useful, but validation of the assays is needed (Cuenca-Estrella et al., 2011; Hsu et al., 2011; Perfect, 2013). Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) protocols are useful tools for the diagnosis of fungal infections as they allow the detection of small amounts of fungal DNA in clinical samples. Conventional PCR and RT-PCR approaches for the

[☆] Presented in part at the 6th Trends in Medical Mycology conference in Copenhagen October, 2013. Gago, S, M. J. Buitrago, K. V. Clemons, M. Cuenca-Estrella, and D. A. Stevens. Development and validation of a quantitative Real-Time PCR assay for the early diagnosis of coccidioidomycosis. 6th Trends in Medical Mycology, 24 Copenhagen, Oct. 2013.

* Corresponding author. Tel.: +1-408-998-4557; fax: +1-408-998-2723.
E-mail address: Clemons@cimr.org (K.V. Clemons).

diagnosis and identification of *Coccidioides* spp. have been described previously; however, their sensitivity and specificity in clinical samples have varied (Bialek et al., 2004; Binnicker et al., 2007; Sheff et al., 2010; Vucicevic et al., 2010).

Animal models of coccidioidomycosis are useful, since their susceptibility to the infection is similar to that described in humans (Shubitz, 2007). Although rabbits have proven to be a good model of coccidioid meningitis, mouse models are the most frequently used for pulmonary and systemic infections (Clemons et al., 2007). Furthermore, animal models have been used to demonstrate the usefulness of RT-PCR protocols compared to colony-forming unit (CFU) enumeration for monitoring fungal burdens of mycelial organisms during the course of the infection (Abad-Diaz-De-Cerio et al., 2013; Bowman et al., 2001; Buitrago et al., 2005; Clemons and Stevens, 2009; Morton et al., 2011; Singh et al., 2005).

In this report, we describe the development of an RT-PCR approach for the diagnosis of coccidioidomycosis. Validation of the technique was performed using unrelated clinical strains and tissues from a mouse model of systemic coccidioidomycosis. We analyzed the correlation of the RT-PCR and the CFU enumeration to determine the progression of the infection and the utility of the RT-PCR assay. The sensitivity of the RT-PCR assay was also tested in paraffin-embedded samples from animal models of coccidioid meningitis and samples from patients.

2. Materials and methods

2.1. Design of the RT-PCR assay

2.1.1. Primers and probe design

PCR primers and a molecular beacon probe were designed on the basis of the consensus DNA sequence of the internal transcribed spacer (ITS) region from the rDNA of 16 strains of *C. immitis* and *C. posadasii* (Table 1). Three of these strains belonged to the Mould Collection from the Spanish National Center of Microbiology. Sequences for the remaining strains were obtained from GenBank. The complete ITS region sequences, aligned by using Mega 5.1 Software (Tamura et al., 2011), were used for primer and molecular beacon probe design using Beacon Designer 70 Software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA). The primers and molecular beacon probe selected were subjected to a BLASTn search in the GenBank database, and in the database of the Department of Mycology of the Spanish National Center for Microbiology, the latter of which contains more than 8000 mould sequences, to avoid cross-homology with other species, as well as be genus-specific for *Coccidioides*. The primers, CIP-

1 ('5-CACCCGTGTTTACTGAAC-3'), CIP-2 ('5-CAAAGATTCCGATGATT-CAC-3'), and the molecular beacon probe MB-CIP (6FAM-CGCGATCT-TATGTGAAGATTGTCAGTCTGAGCAGATCGCG-BHQ1) are located in a conserved region of the ITS1, which avoids differences between the 2 species of *Coccidioides*.

A previously described internal control, designed on the basis of a jellyfish-derived sequence cloned into a pICJF plasmid, with a specific molecular beacon end-labeled with CY5 and a pair of primers, was also included in each assay (Bernal-Martinez et al., 2013).

2.1.2. Fungal strains

Genomic DNA (gDNA) from *C. posadasii* strain Silveira (ATCC28898), *C. posadasii* (CNM-CM-2912), and *C. immitis* (CNM-CMM 7056) were used to standardize the RT-PCR assay. The specificity of this assay was assessed by including gDNA from other fungal pathogens from the mould and yeast culture collection of the Spanish National Center of Microbiology. These were: *Candida albicans* (CNM-CL-5719), *Candida parapsilosis* (CNM-CL 5683), *Candida tropicalis* (CNM-CL 5742), *Candida glabrata* (CNM-CL 5533), *Candida guilliermondii* (CNM-CL 7127), *Candida krusei* (CNM-CL 7057), *Histoplasma capsulatum* (CNM-CM 2721), *Paracoccidioides brasiliensis* (CNM-CL 2902), *Aspergillus fumigatus* (CNM-CM AF237, CNM-CM 7012, CNM-CM 7168), *Aspergillus ochraceus* (CNM-CM 7033), *Aspergillus alliaceus* (CNM-CM 7036), *Aspergillus terreus* (CNM-CM 7082, CNM-CM 3508), *Aspergillus lentulus* (CNM-CM 7152), *Aspergillus clavatus* (CNM-CM 7169), *Aspergillus flavus* (CNM-CM 7198, CNM-CM 3509), *Blastomyces dermatitidis* (CNM-CM 3113, CNM-CM 3114, CNM-CM 3115, CNM-CM 3192), *Fusarium oxysporum* (CNM-CM 2914), *Fusarium solani* (CNM-CM 3035), *Scedosporium prolificans* (CNM-CM 1627), *Scedosporium apiospermum* (CNM-CM 3169), *Rhizopus arrhizus* (CNM-CM 3020), *Rhizopus microsporus* (CNM-CM 4244), *Cryptococcus neoformans var. neoformans* (CNM-CL 3801), *Cryptococcus gattii* (CNM-CL 5007). Human and mouse DNA (Promega, Madrid, Spain) were also tested. All fungal strains had been identified previously by amplification and sequencing of the ITS region of their rDNA.

2.1.3. Fungal DNA extraction

DNA extractions from the mycelia of *H. capsulatum*, *C. immitis*, *C. posadasii*, and *P. brasiliensis* were performed in biosafety level III facilities using Wizard Genomic Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions and in compliance with the Spanish laws (Real Decreto 664/1997), following the recommendations described by the CDC (2009). DNA extraction from the other filamentous fungi and yeast species was performed using a phenol-chloroform method (Tang et al., 1993).

2.1.4. RT-PCR assay

PCR reactions were performed in a Chromo 4 thermocycler real time detection system (Biorad, Hercules, CA, USA). A 2× SensiMix Probe II kit (Bioline, Taunton, MA, USA) was used following the recommendations of the manufacturer. The PCR reactions (20 µL final volume) contained 10 µL of the SensiMix mastermix (i.e., dNTPS, Taq, MgCl₂, etc.), 0.5 µmol/L of each CIP primer, 0.25 µmol/L of the internal control primers, 0.2 µmol/L CPI probe, 0.1 µmol/L of internal control probe, 2 fg of the internal control plasmid (pICJF), and 2 µL of the fungal DNA. The thermocycling conditions were as follows: an initial step of 95 °C for 10 min followed by 50 cycles of 95 °C for 25 s, 50 °C for 30 s, and 72 °C for 15 s. Results were considered positive when a significant fluorescent signal above the baseline was detected, as determined by second-derivate analysis, and were expressed as the crossing point (Cp).

Standard curves were constructed from PCR results from four repetitions of dilutions (from 2 ng to 2 fg of gDNA per reaction) of *C. posadasii* CNM-CM-7056, *C. posadasii* strain Silveira, and *C. immitis* CNM-CM-7056. A linear regression line ($y = mx + b$) was generated

Table 1

Species identification and GenBank identification numbers from the strains used for primers and probe design in this study.

Strain	Species	GenBank ID*
Strain Silveira (ATCC28868)	<i>C. posadasii</i>	AB232886
CBS 113846	<i>C. posadasii</i>	AB186786
CBS 113843	<i>C. posadasii</i>	AB186785
CNM-CM-2912	<i>C. posadasii</i>	KF700275
CNM-CM-2911	<i>C. posadasii</i>	KF700274
RMSCC1036	<i>C. posadasii</i>	HQ219089
IFM 45815	<i>C. immitis</i>	AB232890
IFM 45816	<i>C. immitis</i>	AB232891
IFM 50992	<i>C. immitis</i>	AB232894
IFM 50995	<i>C. immitis</i>	AB232897
CBS 116.51	<i>C. immitis</i>	EF186783
CBS 113852	<i>C. immitis</i>	EF186787
CBS 113851	<i>C. immitis</i>	EF186788
CBS 113856	<i>C. immitis</i>	EF186789
RMSCC2099	<i>C. immitis</i>	EF186790
CNM-CM-7056	<i>C. immitis</i>	KF700276

* Sequence submission ID.

ARTICLE IN PRESS

S. Gago et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xxx (2014) xxx–xxx

3

to determine sensitivity and reproducibility of the assay. To evaluate the specificity of the assay, 2 ng of gDNA per reaction from each of the other fungal species or nonfungal gDNA was tested in the assay. Positive controls consisting of 20 fg of gDNA per reaction from *C. immitis* CNM-CM-7056 or *C. posadasii* strain Silveira were included in each run. Negative controls consisting of PCR-grade water were also included.

2.2. RT-PCR assay on clinical isolates

The utility of the RT-PCR was assessed using gDNA extracted from 20 unrelated clinical isolates previously identified as *Coccidioides* spp. by morphological characteristics and GenProbe hybridization. The origins of the samples were diverse (Table 2). Strains were grown in glucose yeast extract peptone broth (2% glucose, 0.3% yeast extract, 1% peptone) for 3 days at ambient room temperature on a gyratory shaker. gDNA from these isolates was obtained by using Wizard Genomic Purification kit (Promega) according to manufacturer's instructions. Two microliters of the gDNA was tested in duplicate for each of the isolates. Positive controls consisted of 20 fg per reaction of gDNA from *C. immitis* CNM-CM-7056 or *C. posadasii* strain Silveira and were included in each run. Negative controls consisting of PCR-grade water were also included.

2.3. RT-PCR assay on tissue samples from infected mice

2.3.1. Infection model

To establish a model of systemic coccidioidomycosis, 5-week-old specific-pathogen-free female CD-1 mice (Charles River, Hollister, CA, USA) were infected intravenously with 250 arthroconidia in 0.25 mL from *C. posadasii* (Silveira strain) as previously described (Clemons et al., 1985; Clemons et al., 1990). The viability of the primary inoculum (10^3 arthroconidia/mL) was determined by quantitative plating. Two separate experiments were done. In the first, there were 5 mice per time-point sampled, and in the second experiment, there were 10 mice per time-point sampled. Thus, a total of 15 mice were included in each group from 2 different experiments. All mice were randomly preassigned to sample days prior to infection. Infected mice were housed under conventional conditions in microisolator cages. Eight uninfected mice were used as controls. Mice were provided irradiated food and acidified water ad libitum. All procedures were

done in accordance with an approved protocol of the Institutional Animal Care and Use Committee of the California Institute for Medical Research following the guidelines set forth by the Office of Laboratory Animal Welfare of the National Institutes for Health. Mice were euthanized on day 5, 10, or 14 postinfection. While under isoflurane anesthesia, mice were exsanguinated by severing the brachial artery and blood collected to tubes containing EDTA. After euthanasia, the spleen, liver, and lung were removed aseptically.

The CFUs and conidial equivalents (CE) in organs were determined by quantitative plating and RT-PCR, respectively. Whole blood was also evaluated by RT-PCR. Each organ was weighed, placed in a WhirlPak bag (Nasco, Fort Atkinson, WI, USA), and homogenized in 5 mL of sterile saline containing penicillin (1000 IU) and streptomycin (1000 µg/mL) as previously described (Singh et al., 2005). For CFU enumeration, the homogenates were serially diluted in 10-fold steps, and the CFU were determined by plate counts (Clemons et al., 1985; Clemons et al., 1990; Clemons et al., 2007). Fungal organ burdens were expressed as the \log_{10} number of CFU per entire organ.

For CE determinations by RT-PCR, DNA was extracted using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Sciences, Gaithersburg, MD, USA). Prior to the extraction, 1 mL of organ homogenate or the whole blood was transferred to a sterile 2 mL tube containing 1 mL of 0.5-mm diameter zirconium beads and 3×10^5 copies of the pICJF plasmid used as internal control in the RT-PCR assay. Tissue and hyphae were disrupted further by agitation in a Bead Beater homogenizer (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) (Bowman et al., 2001; Singh et al., 2005). For DNA extraction from tissue samples, 20 µL of proteinase K solution and 200 µL of ATL buffer (both included in the QIAamp kit) were added to 500 µL of the secondary homogenate and incubated for 1 h at 56 °C. DNA from blood samples was isolated according to manufacturer's instructions. The DNA was recovered in 50 µL of the elution buffer and stored at -20 °C until analysis. DNA from each tissue sample was run in duplicate, and the concentration of DNA/µL of homogenate was determined from the regression equation of the line obtained in the standardization of the PCR. Fungal burden was reported as number of CE per organ. Because arthroconidia or endospores are uninucleate, CE equates to numbers of nuclei in the mycelium or arthroconidia (in vitro cultures) or immature spherules or endospores (in vivo). For unit conversion, we considered that 1 fg of gDNA equates to 1 Mb (Dolezel et al., 2003), and the size of the genome of *C. posadasii* strain Silveira is 27 Mb (Sharpton et al., 2009). RT-PCR was performed according to the conditions described earlier and included positive and negative controls. Negative controls for the DNA isolation from blood and tissue samples were also performed to monitor crossover contamination.

The utility of the RT-PCR for the diagnosis of coccidioidomycosis was also determined using 21 paraffin-embedded samples of brain stored in our collection from previous studies on mouse (Kamberi et al., 2003) and rabbit models of coccidioidal meningitis (Capilla et al., 2007). Animals that were untreated or had been treated with amphotericin B were included in the samples. Shavings from the blocks were processed as described by Buitrago et al. (2013). Fifty microliters of buffer was used for elution, and 2 µL of DNA was included in each RT-PCR reaction.

2.4. RT-PCR on clinical samples:

The RT-PCR was also validated using clinical samples from patients with a known diagnosis. These samples were from the laboratories' materials that had been stored for future reference. Samples were de-identified, with no patient information included. A total of 40 specimens (17 clot, 17 serum, 1 lung biopsy, and 5 cerebrospinal fluid [CSF]) from 17 patients diagnosed with systemic coccidioidal infection, pulmonary coccidioidomycosis, coccidioidal meningitis, or other fungal infections were evaluated. Patients diagnosed with coccidioidal meningitis did not present acute infection when the

Table 2
Clinical isolates used for the standardization and validation of the RT-PCR assay.

Strain	Geographic origin
CNM-CM-2911	Argentina
CNM-CM-2912	Argentina
CNM-CM-7056	California
Silveira (ATCC28868)	California
98-82	Tucson, Arizona
98-84	Tucson, Arizona
98-118	Phoenix, Arizona
98-138	Bakersfield, California
01-226	Arizona
05-104	Texas
08-29	Fresno, California
11-46	San Jose, California
97-203	Phoenix, Arizona
98-81	Tucson, Arizona
98-83	Tucson, Arizona
98-128	Visalia, California
98-137	Bakersfield, California
05-97	Arizona
05-103	San Antonio, Texas
10-117	Salinas, California
01-251	Sacramento, California
99-35	Fresno, California
98-30	San Diego, California

Please cite this article as: Gago S, et al, Development and validation of a quantitative real-time PCR assay for the early diagnosis of coccidioidomycosis, *Diagn Microbiol Infect Dis* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.029>

Table 3
RT-PCR results for clinical samples from patients with coccidioidal and noncoccidioidal infection.

No.	Case	Sample	PCR result	Fungal infection
1	13-0-126	Clot and serum	Positive	SC ^a
2	13-0-127	CSF ventricular	Positive	CM
	13-0-128	CSF	Negative	
	13-0-111	Clot and serum	Negative	
3	13-0-129	CSF	Negative	CM
	13-0-105	Clot and serum	Negative	
4	13-0-94	Clot and serum	Negative	FI
	13-0-99	Clot and serum	Negative	
5	13-0-98	Clot and serum	Negative	CM
6	13-0-97	Clot and serum	Negative	FI
7	13-0-96	Clot and serum	Negative	CM
8	13-0-100	Clot and serum	Negative	CM
	13-0-130	CSF	Negative	
9	13-0-95	Clot and serum	Negative	CM
10	13-0-131	CSF	Negative	CM
	13-0-106	Clot and serum	Negative	
11	13-0-107	Clot and serum	Negative	CM
12	103-0-104	Clot and serum	Negative	CM
13	13-0-103	Clot and serum	Negative	FI
14	13-0-102	Clot and serum	Negative	FI
15	13-0-108	Clot and serum	Negative	PC
16	13-0-109	Clot and serum	Negative	FI
17	13-0-132	Lung biopsy	Positive	SC ^a

SC = systemic coccidioidomycosis; PC = pulmonary coccidioidomycosis; CM = coccidioidal meningitis; FI = other fungal infection; #4: Scedosporiosis; #6 Candidiasis; #13 Aspergillosis; # 14 Onychomycosis; #16 Mucormycosis.

^a Patients diagnosed with SC had positive cultures.

sample was taken, and they were also on therapy when the sample was taken. Blood and CSF samples were processed as described above in the murine studies. For lung biopsy, 45 mg of tissue was processed using Qiamp DNA Minikit according to manufacturer's instructions. Characteristics of the patients and samples analyzed are shown in Table 3. Two microliters of the sample DNA was used in each reaction. Samples were run in duplicate.

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism Software version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Fungal burdens determined by plating (CFU) or RT-PCR (CE) were converted to \log_{10} and compared using a nonparametric Mann–Whitney U test, and sensitivity of the assay was determined by Kappa statistics. Statistical correlation between \log_{10} CFU and \log_{10} CE was determined for each organ for each day by determining a Spearman correlation coefficient. Linear regression analysis was used to compare the progression of the infection for each of the organs by fungal burden determination using RT-PCR or quantitative plating, and the regression lines were compared. *P* values were considered significant at the .05 level.

3. Results

3.1. In vitro standardization of the RT-PCR assay

The designed RT-PCR assay targeted within the ITS1 region of the rDNA of *Coccidioides* could reliably detect *C. immitis* and *C. posadasii* DNA. The sensitivity of the assay was 1 fg of genomic fungal DNA per microliter of reaction (i.e., a total of 20 fg of gDNA per reaction). Crossing point values and the 10-fold dilutions of gDNA showed a significant linear correlation, with a high coefficient of determination ($r^2 = 0.997$, $P < 0.01$). The mean overall coefficient of variation (CV) was 1.13% (range, 0.5–2.13%). For the internal control included in each run, the mean of the C_p was 30.69 ± 0.45 (CV = 1.47%). The specificity of the assay for *Coccidioides* in vitro was 100%. No positive

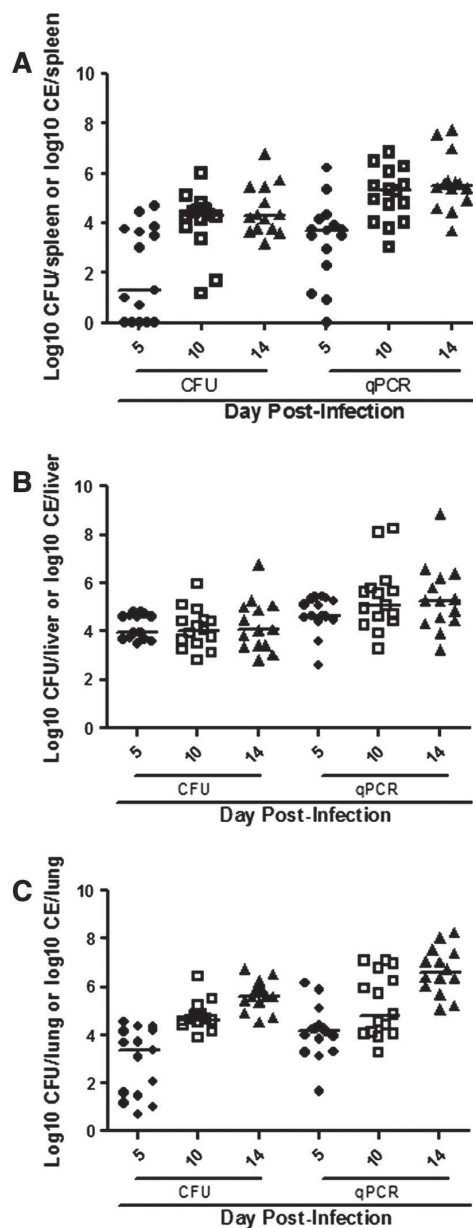


Fig. 1. Scattergrams of CFU and CE recovered from the (A) spleen, (B) liver, and (C) lung of surviving mice. \log_{10} of the CFU/organ or CE/organ is represented; the bars represent median group values. Mice included as controls were euthanized at day 10. A value of 0 indicates that no CFU was recovered and infection was below the limit of detection of the assay.

amplification signal was detected when gDNA from 17 unrelated fungi or gDNA from human or mouse was included in the assay. Twenty unrelated clinical isolates previously identified as *Coccidioides* spp. showed amplification signals indicating the detection of all isolates as *Coccidioides* (100% sensitivity).

3.2. Validation of the RT-PCR on samples from infected mouse

C. posadasii recovered from the tissues of surviving mice and quantified by CFU determination or RT-PCR analysis is shown in Fig. 1.

ARTICLE IN PRESS

S. Gago et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xxx (2014) xxx–xxx

5

Table 4
Sensitivity of the PCR assay and culture in tissue samples from mice and agreement between CFU and RT-PCR were performed by kappa statistics.

Technique	Percent sensitivity (no. mice positive/no. of mice sampled)		
	Spleen	Liver	Lung
RT-PCR	97.7% (43/44)	100% (44/44)	100% (44/44)
Culture	88.6% (39/44)	100% (44/44)	100% (44/44)
Comparison between CFU and culture			
	Spleen	Liver	Lung
Agreements	98.8%	100%	100%
Kappa	0.936	1	1
SE of kappa	0.064	0	0
Strength of agreement	Very good	Perfect	Perfect

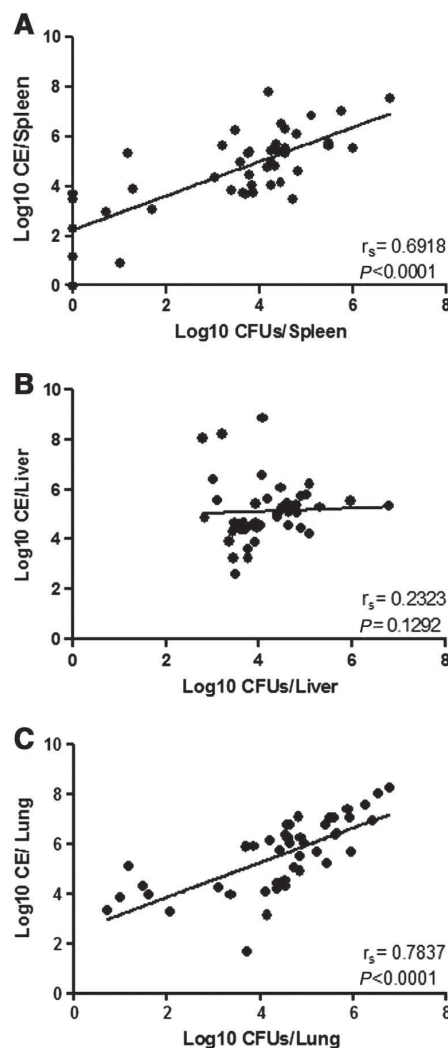
Fungal burden determined by RT-PCR was higher (10- to 1000-fold) than it was by CFU enumeration ($P < 0.05$) for each of the days sampled. Samples from uninfected controls were negative in the RT-PCR assay. Sensitivity of the RT-PCR was 97.7% (43/44), 100% (44/44), and 100% (44/44) for spleen, liver, and lung, respectively. Samples that had a negative RT-PCR result also had negative CFU determinations (Table 4). Interestingly, the sensitivity of culture for spleens was lower than it was using RT-PCR (88.6% versus 97.7%); however, sensitivity of CFU and RT-PCR was the same for livers and lungs. Five of 6 samples of spleen that had a negative CFU determination were shown positive by the RT-PCR results. A very good agreement between the 2 approaches was found as determined by a kappa statistic (kappa = 0.93 for spleen and kappa = 1 for liver and lung) indicating that our RT-PCR approach is highly reliable (Table 4).

In the spleen, the progression of the infection was determined as an increase in the median numbers of \log_{10} CFU/organ or \log_{10} CE/organ. Statistical analysis using the Mann–Whitney U test showed that both numbers had increased significantly on days 10 and 14 compared to day 5 ($P = 0.001$ and $P < 0.0001$ respectively). However, in the liver, differences in the fungal burden between sample days during the infection could not be detected by CFU or PCR ($P > 0.05$). In the lungs, as well as in spleens, the recovery of *Coccidioides* showed increases in the values of the \log_{10} CFU/lung and \log_{10} CE/lung on each day postinfection; the number of CE and CFU increased on days 10 and 14 compared to day 5 ($P < 0.0001$ for both).

Correlation between the methods of quantifying the fungal burdens in each organ was determined using the CFU and CE obtained from each mouse on a sample day. On day 5 or 10, there were 15 matched samples of CFU and CE determination from each organ, and on day 14, there were 14 matched samples of CFU and CE for each organ. Except for livers on day 10 postinfection, the Spearman correlation index (r_s) was positive for all the groups, which indicates the 2 methods reflect changes in CFU or CE in the same direction of increase or decrease (Table 5). When examining the correlation

Table 5
Correlation analysis between CFU and RT-PCR for the evaluation of the progression of coccidioidomycosis in the mouse model.

Tissue	Day	r_s	P value
Spleen	5	0.6292	0.0012
Spleen	10	0.7357	0.0018
Spleen	14	0.5165	0.0586
Liver	5	0.5964	0.0189
Liver	10	-0.1107	0.6945
Liver	14	0.3231	0.2599
Lung	5	0.2143	0.4431
Lung	10	0.4167	0.1283
Lung	14	0.7055	0.0048

 r_s is the Spearman correlation coefficient.**Fig. 2.** Global Spearman correlation analysis for spleen, liver, and lungs from infected mice. Spearman correlation index (r_s) and P values are shown for each of the organs.

between CFU and CE recovered from the organs on individual days postinfection ($n = 15$ on days 5 or 10, $n = 14$ on day 14), there was significant correlation ($P < 0.05$) between the 2 methods on all days for spleen, only on day 5 for liver, and only on day 14 for lung, indicating the 2 methods reflected changes to CFU or CE in the same direction. Spearman correlations for liver on days 10 or 14 and lungs on days 5 or 10 were not significant ($P > 0.05$), indicating a poorer reflection of the CFU or CE changing together in the same direction of increase or decrease. In addition to the correlations done for each day, a global correlation approximation was also performed using all CFU or CE and disregarding the day postinfection. This analysis showed a positive r_s for each of the 3 organs ($r_s = 0.69$ for spleen, $r_s = 0.23$ for liver, and $r_s = 0.78$ for lung); the correlation between the techniques for spleen and lung was significant ($P < 0.0001$) but was not significant for the liver ($P = 0.13$) (Fig. 2).

Linear regression analysis of the \log_{10} CFU/organ and \log_{10} CE/organ following progressive infection in mice was calculated for days 5, 10, and 14 (Fig. 3). Linear regression lines were compared and showed the slopes of the CFU and CE lines were not statistically different for any organ ($P > 0.05$ for each of the organs) (Fig. 3).

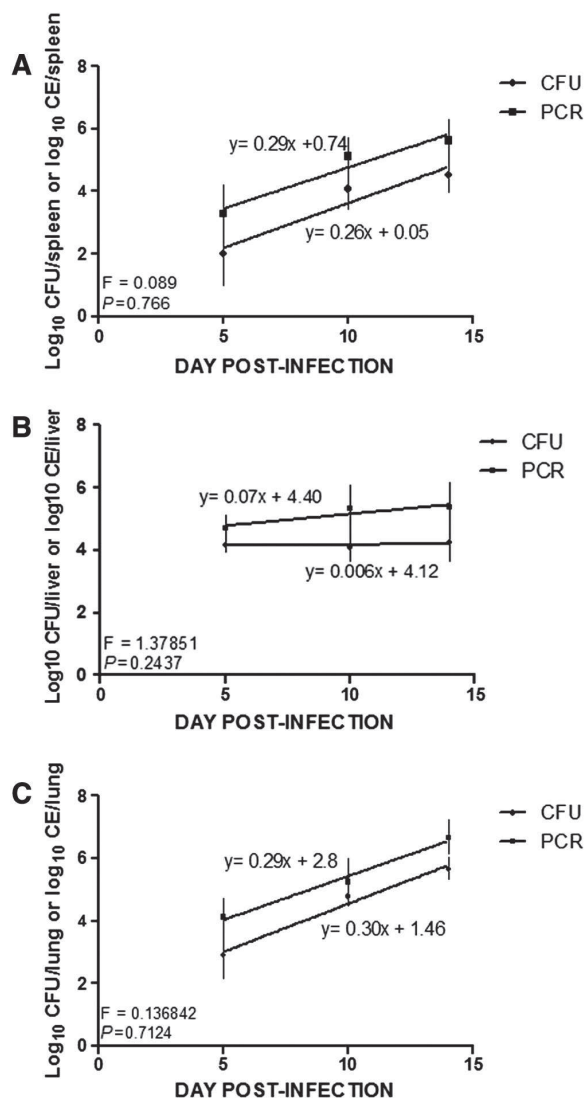


Fig. 3. Linear regression lines of \log_{10} CFU and \log_{10} CE/organ from infected mice following progressive infection in the (A) spleen, (B) liver, and (C) lung. Equation of the lines, F statistics, and P values are shown. Data points represent the mean \log_{10} value and the 95% confidence interval.

The RT-PCR assay was also positive for all paraffin-embedded brain tissues from rabbits (15/15) or mice (6/6), which were obtained from models of coccidioidal meningitis (100% sensitivity).

3.3. Validation of the assay on clinical samples

The RT-PCR assay was performed on 40 samples from 17 patients (Table 3). The PCR was positive in clot, serum, lung biopsy, or CSF from 3 patients. The clinical origin of the samples was diverse, depending on the underlying disease. Samples from 12 patients diagnosed with acute infection or under treatment for coccidioidal infection were included in the assay. For 2 of the 12 patients diagnosed with systemic coccidioidomycosis, both cultures and RT-PCR were positive in blood (clot and serum) and lung biopsy, respectively. For the other 10 patients diagnosed with coccidioidomycosis (pulmonary or meningitis), the PCR was negative; in these patients, the diagnosis was previously established, and no signs of acute infection were

demonstrated at the time the samples had been obtained. For 1 of these 10 patients, who had been diagnosed with coccidioidal meningitis, the RT-PCR result was positive on a sample of the ventricular CSF obtained via an indwelling Ommaya reservoir. No positive PCR results were obtained for patients diagnosed with fungal infections other than coccidioidomycosis (Table 3).

4. Discussion

The aim of this study was the development of an RT-PCR assay for the specific diagnosis of coccidioidomycosis. Furthermore, we assessed whether RT-PCR and CFU determinations of fungal burden correlated in showing the progression of the infection in a mouse model of systemic coccidioidomycosis as a measure of validating the RT-PCR assay. Molecular techniques have been described to be very useful for the correct identification of various fungal species (Cuenca-Estrella et al., 2011). However, molecular diagnostic tools based on RT-PCR for coccidioidomycosis have not been widely described. Some are based on the analysis of melting curves (Bialek et al., 2004; Binnicker et al., 2007), but an RT-PCR approach using molecular beacon probes for the simultaneous detection of gDNA from *C. immitis* and *C. posadasii* has not been described previously.

Because clinical signs of coccidioidomycosis are nonspecific and the increased numbers of case reports of infections in nonendemic areas (Desai et al., 2010; Desai et al., 2001; Kwok et al., 2009; Oberoi et al., 2012), rapid, specific, and sensitive assays are needed for diagnosis, especially if positive early in infection, and potentially could also be useful for the evaluation of the therapeutic outcome. The RT-PCR assay that we developed in this work specifically detects gDNA from *C. immitis* or *C. posadasii* and includes an internal control to monitor for false negatives due to PCR inhibition. The assay was specific (100%), reproducible, and showed a good sensitivity with results obtainable in about 3 h. Although the differentiation into *C. immitis* and *C. posadasii* spp. is very interesting for evolutionary studies, for clinical management, the progression of the infection and management of disease is similar for both species. Moreover, because there are few ITS sequences of *Coccidioides* available in databases, and the differences between the 2 species are based on a very few nucleotides (Brilhante et al., 2013), the design of a single probe to detect either species makes the assay more specific and sensitive for coccidioidomycosis (Schoch et al., 2012). Although there are some studies examining the utility of mono-copy genes for *Coccidioides* RT-PCR approaches (Bialek et al., 2004; Bialek et al., 2005), the ITS region of the rDNA is considered the DNA barcode for fungal identification (Schoch et al., 2012) and is a multi-copy target. The high number of copies of the ITS per arthroconidium in *C. posadasii* (Sharpton et al., 2009) increases the sensitivity of the assay.

The quantification of microorganisms is a microbiological tool to estimate the total number of microorganisms present in a sample (Clemons and Stevens, 2009). The utility of RT-PCR assays to quantify fungal DNA in tissue samples from experimentally infected animals has been described in several publications on disseminated fungal infections, with these assays showing variable sensitivity, specificity, and correlations with cultures (Abad-Diaz-De-Cerio et al., 2013; Bernal-Martinez et al., 2012; Bowman et al., 2001; Buitrago et al., 2005; Castelli et al., 2008; Clemons and Stevens, 2009; Morton et al., 2011; Singh et al., 2005). The results presented in our study provide the first description of an RT-PCR based quantification of *C. posadasii* burden in the tissues in an animal model of infection. Although agreement between CFU enumeration and RT-PCR determinations was very good, we feel that our RT-PCR assay provided a more accurate reflection of *Coccidioides* burdens than did CFU determinations, for all tissue samples, and for each of the days tested. Fungal burdens determined by RT-PCR were 10- to 1000-fold higher than were the CFU. Tissue samples likely contained maturing or mature spherules, which conceivably could yield only 1 CFU on culture but

ARTICLE IN PRESS

S. Gago et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xxx (2014) xxx–xxx

7

have many nuclei, which contributed to a better detection by quantitative polymerase chain reaction. In addition, the sensitivity in spleen was also higher by PCR (43/44; 97.7%) than by CFU determination (39/44; 88%). The single mouse that showed a negative RT-PCR result also had a negative culture. In evaluating progression of the infection in the tissues of infected animals by CFU, burdens increased each day postinfection for spleen and lung, but not for liver. Interestingly, slight differences in the fungal load determined by RT-PCR in liver could be detected, and it could be related to an increased sensitivity of the RT-PCR approach. Although differences in the magnitude of the burden for each of the organs studied were detected by RT-PCR and CFU determinations, regression analysis suggested that the assays are equivalent for the evaluation of the progression of the infection, although RT-PCR approaches are more sensitive.

Blood samples from the infected mice showed a negative RT-PCR result, and no PCR inhibition was detected; cultures with these samples were not performed. Although it may be surprising, the sensitivity of blood cultures is very low, and some studies have shown that it may be lower than 0.4% for coccidioidomycosis (Saubolle et al., 2007). It is possible that fungemia occurs when the infection is uncontrolled and the animals are moribund; other possibilities are that, in fungemia, the fungal load in serum is lower than the limit of detection of the assay or fungemia could be intermittent. Johnson et al. (2004) described the usefulness of a pair of primers to amplify *Coccidioides* DNA from serum samples from infected patients. However, Bialek et al. (2005) demonstrated that those primers were nonspecific, and no other published article has demonstrated the presence of coccidioidal DNA in serum or blood samples from infected patients.

Our RT-PCR approach was also validated using 40 samples from 17 patients, including 4 patients diagnosed with other fungal infections. The assay reliably detected *Coccidioides* DNA in the specimens from the 2 patients who had positive cultures concurrent with the samples used for performance of the RT-PCR assay; however, the PCR was negative in those patients who had been undergoing extended antifungal treatment, did not present signs of acute infection at the time we received the sample, or presented another unrelated fungal infection. Although we did not obtain positive PCR results using blood from infected mice, for 1 patient, the PCR was positive for both the clot and serum. It has been reported that *Coccidioides* fungemia is associated with immunosuppression and high mortality (Adam et al., 2009; Keckich et al., 2010; Rempel et al., 2007). For 1 of the patients diagnosed with coccidioidal meningitis, we obtained a positive PCR result, although no signs of acute infection were noted at the time the clinical sample was obtained. However, the sample was taken from a device used to administer the antifungal, and our positive result could reflect transient colonization of hardware; the sample collected 15 days later showed a negative PCR result. Furthermore, our assay exhibited 100% (21/21) sensitivity using paraffin-embedded tissue samples from animal models of coccidioidal meningitis. Human blood and CSF specimens were largely used for validation; this was determined by specimen availability, as these are the likeliest clinical specimens to be stored. Tissue samples of patients will need to be collected prospectively, to ascertain whether our assay is equally efficacious in a variety of human solid tissues compared to what we have demonstrated in murine tissues.

Several articles reporting the utility of RT-PCR for the diagnosis of coccidioidomycosis have been published. Bialek et al. (2004) and Binnicker et al. (2007) described RT-PCR based on the use of Taqman probes and FRET hybridization probes, respectively, for the diagnosis of coccidioidomycosis. These probes were based on the nucleotide sequence of the Antigen2/Proline-Rich Antigen, a monocopy gene, and the ITS-2 region (Bialek et al., 2004; Binnicker et al., 2007). Although the specificity and sensitivity of both techniques on cultured isolates were 100%, the lower limit of detection was lower in our RT-

PCR assay (i.e., 10 fg/μL of DNA per reaction versus 1 fg/μL per reaction in our assay). The utility of the RT-PCR approach described by Binnicker et al. (2007) has been validated for clinical samples from patients with a positive culture result; however, the utility of this technique seems to be limited in paraffin-embedded tissues (74% sensitivity). In contrast, Thompson et al. (2013) compared a standard RT-PCR with the PCR procedures from the Translational Genomics Research Institute (Vucicevic et al., 2010). In that study, they showed that the PCR assays did not improve the sensitivity of detection over culture, which is in contrast to what our animal model studies showed, and false negatives could be produced (Vucicevic et al., 2010). In addition, Sheff et al. (2010) described an RT-PCR approach for the differentiation of *C. immitis* and *C. posadasii* species based on TaqMan probes designed by genome comparison; although this RT-PCR was 100% specific, validation using clinical specimens was not done. The advantages of our technique compared to those previously described are: our limit of detection is lower than those previously reported; we include an internal control, which ensures that there has not been inhibition of the PCR reaction; our RT-PCR appeared to accurately reflect the progression of infection in the mouse model and may prove useful in monitoring patients' outcome.

In conclusion, the RT-PCR protocol described here allows for rapid and sensitive detection of *Coccidioides* spp. gDNA. This method could be very useful to monitor the progression of the infection and to contribute to the establishment of an early diagnosis. However, further validation with substantial numbers of clinical samples from patients is needed.

Acknowledgments

This work was supported by research project PI11/00412 from Spanish "Fondo de Investigaciones Sanitarias" of the Instituto de Salud Carlos III. S.G. is supported by a research fellowship from the "Fondo de Investigaciones Biomédicas" of the Spanish Ministry of Science and Innovation (FI10/00464). M.C.-E. has received grant support from Astellas Pharma, bioMérieux, Gilead Sciences, MSD, Pfizer, Schering-Plough, Soria Melguizo S.A., Ferrer International, the European Union, the ALBAN program, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, The Spanish Health Research Fund, The Instituto de Salud Carlos III, The Ramon Areces Foundation, and The Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, MSD, Pfizer, Astellas, and Schering-Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, MSD, Pfizer, Astellas, and Schering-Plough. M.J.B., K.V.C., and D.A.S. have no conflicts of interest.

References

- Abad-Diaz-De-Cerio A, Fernandez-Molina JV, Ramirez-Garcia A, Sendino J, Hernando FL, Peman J, et al. The aspHS gene as a new target for detecting *Aspergillus fumigatus* during infections by quantitative real-time PCR. *Med Mycol* 2013;51:545–54.
- Adam RD, Elliott SP, Taljanovic MS. The spectrum and presentation of disseminated coccidioidomycosis. *Am J Med* 2009;122:770–7.
- Ampel NM. The diagnosis of coccidioidomycosis. *F1000 Med Rep* 2010;2. pii: 2. <http://dx.doi.org/10.3410/M2-2>.
- Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of invasive infection caused by *Fusarium solani* and non-*Fusarium solani* species using a duplex quantitative PCR-based assay in a murine model of fusariosis. *Med Mycol* 2012;50:270–5.
- Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Development of a single tube multiplex real-time PCR to detect the most clinically relevant *Mucormycetes* species. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E1–7.
- Bialek R, Kern J, Herrmann T, Tijerina R, Cecenas L, Reischl U, et al. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. *J Clin Microbiol* 2004;42:778–83.
- Bialek R, Gonzalez GM, Begerow D, Zelck UE. Coccidioidomycosis and blastomycosis: advances in molecular diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;45:355–60.
- 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.

Please cite this article as: Gago S, et al, Development and validation of a quantitative real-time PCR assay for the early diagnosis of coccidioidomycosis, *Diagn Microbiol Infect Dis* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.029>

- Bowman JC, Abruzzo GK, Anderson JW, Flattery AM, Gill CJ, Pikounis VB, et al. Quantitative PCR assay to measure *Aspergillus fumigatus* burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3474–81.
- Brilhante RS, de Lima RA, Ribeiro JF, de Camargo ZP, Castelo-Branco Dde S, Grangeiro TB, et al. Genetic diversity of *Coccidioides posadasii* from Brazil. *Med Mycol* 2013;51:432–7.
- Buitrago MJ, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of *Aspergillus* spp. by real-time PCR in a murine model of pulmonary infection [article in Spanish]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23:464–8.
- Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, Bernal-Martinez L, Prieto M, Garcia-Reyne A, et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E271–7.
- Capilla J, Clemons KV, Sobel RA, Stevens DA. Efficacy of amphotericin B lipid complex in a rabbit model of coccidioidal meningitis. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:673–6.
- Castelli MV, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Development and validation of a quantitative PCR assay for diagnosis of scedosporiosis. *J Clin Microbiol* 2008;46:3412–6.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 5th ed. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services; 2009.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Increase in reported coccidioidomycosis—United States, 1998–2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013;62:217–21.
- Clemons KV, Stevens DA. Conventional or molecular measurement of *Aspergillus* load. *Med Mycol* 2009;47(Suppl 1):S132–7.
- Clemons KV, Leathers CR, Lee KW. Systemic *Coccidioides immitis* infection in nude and beige mice. *Infect Immun* 1985;47:814–21.
- Clemons KV, Hanson LH, Perlman AM, Stevens DA. Efficacy of SCH39304 and fluconazole in a murine model of disseminated coccidioidomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:928–30.
- Clemons KV, Capilla J, Stevens DA. Experimental animal models of coccidioidomycosis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1111:208–24.
- Crabtree AC, Keith DG, Diamond HL. Relationship between radiographic hilar lymphadenopathy and serologic titers for *Coccidioides* sp. in dogs in an endemic region. *Vet Radiol Ultrasound* 2008;49:501–3.
- Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Racil Z, Richardson M, Rogers TR. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(Suppl 1):i15–24.
- Desai SA, Minai OA, Gordon SM, O'Neil B, Wiedemann HP, Arroliga AC. Coccidioidomycosis in non-endemic areas: a case series. *Respir Med* 2001;95:305–9.
- Desai NR, McGoey R, Troxclair D, Simeone F, Palomino J. Coccidioidomycosis in nonendemic area: case series and review of literature. *J La State Med Soc* 2010;162:97–103.
- Dixon DM. *Coccidioides immitis* as a Select Agent of bioterrorism. *J Appl Microbiol* 2001;91:602–5.
- Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* 2003;51:127–8.
- Durkin M, Estok L, Hospenthal D, Crum-Cianflone N, Swartzentruber S, Hackett E, et al. Detection of *Coccidioides* antigenemia following dissociation of immune complexes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1453–6.
- Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 2002;94:73–84.
- Hector RF, Rutherford GW, Tsang CA, Erhart LM, McCotter O, Anderson SM, et al. The public health impact of coccidioidomycosis in Arizona and California. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8:1150–73.
- Hsu JL, Ruoss SJ, Bower ND, Lin M, Holodniy M, Stevens DA. Diagnosing invasive fungal disease in critically ill patients. *Crit Rev Microbiol* 2011;37:277–312.
- Johnson SM, Simmons KA, Pappagianis D. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:1982–5.
- Kamberi P, Sobel RA, Clemons KV, Stevens DA, Pappagianis D, Williams PL. A murine model of coccidioidal meningitis. *J Infect Dis* 2003;187:453–60.
- Keckich DW, Blair JE, Vikram HR. *Coccidioides* fungemia in six patients, with a review of the literature. *Mycopathologia* 2010;170:107–15.
- Kuberski T, Herrig J, Pappagianis D. False-positive IgM serology in coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2010;48:2047–9.
- Kwok HK, Chan JW, Li IW, Chu SY, Lam CW. Coccidioidomycosis as a rare cause of pneumonia in non-endemic areas: a short exposure history should not be ignored. *Respirology* 2009;14:617–20.
- Laniado-Laborin R. Expanding understanding of coccidioidomycosis in the western hemisphere. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1111:19–34.
- Morton CO, Clemons KV, Springer J, Mueller JG, Rogers TR, Stevens DA, et al. Real-time PCR and quantitative culture for monitoring of experimental *Aspergillus fumigatus* intracranial infection in neutropenic mice. *J Med Microbiol* 2011;60:913–9.
- Oberoi JK, Wattal C, Aggarwal PK, Khanna S, Basu AK, Verma K. Pulmonary coccidioidomycosis in New Delhi, India. *Infection* 2012;40:699–702.
- Pappagianis D. Epidemiology of coccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1988;2:199–238.
- Pappagianis D. Coccidioidomycosis. *Semin Dermatol* 1993;12:301–9.
- Pappagianis D. Marked increase in cases of coccidioidomycosis in California: 1991, 1992, and 1993. *Clin Infect Dis* 1994;19(Suppl 1):S14–8.
- Perfect JR. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr Med Res Opin* 2013;29(Suppl 4):3–11.
- Rempe S, Sachdev MS, Bhakta R, Pineda-Roman M, Vaz A, Carlson RW. *Coccidioides immitis* fungemia: clinical features and survival in 33 adult patients. *Heart Lung* 2007;36:64–71.
- Saubolle MA. Laboratory aspects in the diagnosis of coccidioidomycosis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1111:301–14.
- Saubolle MA, McKellar PP, Sussland D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2007;45:26–30.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:6241–6.
- Sharpton TJ, Stajich JE, Rounsley SD, Gardner MJ, Wortman JR, Jordar VS, et al. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* 2009;19:1722–31.
- Sheff KW, York ER, Driebe EM, Barker BM, Rounsley SD, Waddell VG, et al. Development of a rapid, cost-effective TaqMan Real-Time PCR Assay for identification and differentiation of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol* 2010;48:466–9.
- Shubitz LF. Comparative aspects of coccidioidomycosis in animals and humans. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1111:395–403.
- Singh G, Imai J, Clemons KV, Stevens DA. Efficacy of caspofungin against central nervous system *Aspergillus fumigatus* infection in mice determined by TaqMan PCR and CFU methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1369–76.
- Sutton DA. Diagnosis of coccidioidomycosis by culture: safety considerations, traditional methods, and susceptibility testing. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1111:315–25.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731–9.
- Tang CM, Cohen J, Krausz T, Van Noorden S, Holden DW. The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 1993;61:1650–6.
- Thompson GR, Sharma S, Bays DJ, Pruitt R, Engelthaler DM, Bowers J, et al. Coccidioidomycosis: adenosine deaminase levels, serologic parameters, culture results, and polymerase chain reaction testing in pleural fluid. *Chest* 2013;143:776–81.
- Vucicevic D, Blair JE, Binnicker MJ, McCullough AE, Kusne S, Vikram HR, et al. The utility of *Coccidioides* polymerase chain reaction testing in the clinical setting. *Mycopathologia* 2010;170:345–51.

4. OBJETIVO SEGUNDO:

Desarrollo de técnicas rápidas de identificación y tipificación basadas en el análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM):

4.1. Identificación de las especies del complejo *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* mediante HRM.

Las infecciones fúngicas debidas a *Cryptococcus* spp. afectan tanto a individuos inmunocomprometidos como inmunocompetentes. La especie *C. neoformans* clásicamente se ha dividido en 5 serotipos (A, B, C, D y AD) que se han agrupado en dos variedades de *C. neoformans*, var. *grubii* (serotipo A) y var. *neoformans* (serotipo D). Los serotipos B y C se han clasificado recientemente como la especie *Cryptococcus gattii*. Además, se ha descrito la existencia de híbridos AD, BD y BA. En este trabajo se ha desarrollado una técnica rápida para la diferenciación de las variedades de *Cryptococcus* spp. mediante análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM). La reacción de PCR se dirigió a la amplificación de una región de 100 pb en el espaciador intergénico 1 (ITS-1) del ADN ribosómico. Las condiciones de PCR y el análisis de las curvas se optimizaron para analizar los productos de amplificación de 27 cepas. Simultáneamente se secuenciaron los fragmentos amplificados. Un procedimiento de doble análisis mediante HRM del producto de PCR de las 27 cepas de *Cryptococcus* spp., permitió discriminar 4 grupos que se correspondían con las variedades *neoformans* (serotipo D e híbridos AD, 12 cepas), var. *grubii* (serotipo A, 10 cepas), var. *gattii* (Serotipos B y C, 4 cepas) e híbridos BD y AB (3 cepas). Los resultados de estos grupos se correspondían con las posiciones polimórficas en la secuencia del fragmento obtenido para cada cepa. Tan solo la cepa CNM-CL 5007 agrupada inicialmente como *C. gattii*, se agrupó con los híbridos BD y AB mediante análisis de secuencia y HRM. Con los resultados de este trabajo se concluye que: (i) el análisis mediante HRM de los productos de PCR es un método rápido y sencillo que puede ser útil para la diferenciación de variedades de *Cryptococcus* spp.; (ii) los híbridos AD son semejantes en secuencia a la var. *neoformans* en el fragmento analizado; (iii) la primera fase del análisis permite la discriminación de *C. gattii* del complejo *C. neoformans*.

High-Resolution Melting Analysis for Identification of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Complex[∇]

Sara Gago, Óscar Zaragoza,* Isabel Cuesta, Juan L. Rodríguez-Tudela, Manuel Cuenca-Estrella, and María J. Buitrago*

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Received 30 May 2011/Returned for modification 8 July 2011/Accepted 28 July 2011

We have developed a two-step method based on high-resolution melting (HRM) that reliably identifies species from the *Cryptococcus* species complex (*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, and *Cryptococcus gattii*). Our results indicate that HRM can provide a fast protocol to identify and distinguish among the main *Cryptococcus* species.

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused mainly by encapsulated yeasts from the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* complex (18). *C. neoformans* particularly infects immunocompromised patients. Within developed countries, the incidence of cryptococcosis increased among patients infected with HIV at the end of the 20th century (11). The introduction of highly active antiretroviral therapy has reduced the incidence, but not the associated mortality, of cryptococcal meningitis (17, 19). In recent years, other factors such as organ transplantation have been associated with an increased risk of acquiring cryptococcosis (1). In addition, its incidence is still significant in developing areas, such as sub-Saharan Africa, where cryptococcosis is estimated to cause approximately 650,000 deaths per year (19). *Cryptococcus gattii* has gained attention among the scientific community because it affects individuals without immune deficiencies (3). Moreover, *C. gattii* was identified as the causative agent of the outbreak that occurred in Vancouver Island, British Columbia, Canada (10), and which seems to be spreading in the northwest of the United States (5).

Classically, *C. neoformans* complex has been divided into serotypes A, B, C, D, and AD based on the differential reactivity of the capsule with rabbit polyclonal sera. Currently, serotypes A and D are classified as *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, respectively. Serotypes B and C have been grouped into a new species, *C. gattii*, due to genetic and biological differences (14). These species and serotypes can also be distinguished by molecular methods (2, 15, 20, 25, 27). *Cryptococcus gattii* can be subdivided into four genotypic groups (12, 27). Several diploid or aneuploid hybrids have been found among these species. The hybrid best studied is the AD serotype, which is formed after conjugation of yeast cells from *C. neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *grubii*. These AD hybrids have been cited as clinically relevant due to frequent isolation from patients in some geographical regions (28). BD and

AB hybrids have been recently reported, but their pathogenicity is still unclear (4).

The serological assay previously used to differentiate cryptococcal serotypes was discontinued by the manufacturer. Currently, the proper classification of the different varieties primarily relies on DNA sequence analysis of a specific target. This approach requires the amplification of the DNA fragments by PCR and further sequencing of the products, representing a costly and time-consuming process. In this study, we have investigated if *C.*

TABLE 1. *Cryptococcus* strains used for 100-bp ITS sequence analysis

Strain	Species, variety, and/or hybrid type	Reference or source
H99 ^f	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	21
CNM-CL3798 ^c	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	SNCM ^a
CNM-CL2132 ^c	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	SNCM
CNM-CL4018 ^c	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	SNCM
CNM-CL5750	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	SNCM
CNM-CL4978	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	SNCM
CNM-CL5539	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	SNCM
CBS 6992 ^d	<i>C. gattii</i>	8
CBS 1622 ^d	<i>C. gattii</i>	3
CBS 10865 (R272) ^c	<i>C. gattii</i>	9
CNM-CL4998	<i>C. gattii</i>	SNCM
NIH 34 ^c	<i>C. gattii</i>	6
NIH 191 ^c	<i>C. gattii</i>	6
NIH 198	<i>C. gattii</i>	6
CNM-CL5007 ^c	<i>C. gattii</i>	SNCM
CBS 10496 ^c	AB	4
CBS 10489 ^c	BD	4
CBS 10490 ^c	BD	4
CNM-CL4839 ^c	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	SNCM
CNM-CL3801 ^c	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	SNCM
CNM-4392 ^c	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	SNCM
24067 ^c	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	7
B3501 ^c	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	13
CNM-CL6434 ^c	AD	SNCM
CNM-CL7041 ^c	AD	SNCM
CNM-CL3825 ^c	AD	SNCM
CNM-CL3796 ^c	AD	SNCM
CNM-CL3797 ^c	AD	SNCM
CNM-3826 ^c	AD	SNCM
CNM-CL4840 ^c	AD	SNCM
CBS 5592 ^d	<i>C. albidus</i>	AY591353.2 ^b
CBS 945 ^d	<i>C. albidus</i>	EF569591.1 ^b
CBS 6436 ^d	<i>C. diffluens</i>	24
CBS 8126 ^d	<i>C. curvatus</i>	24
ATCC 18803 ^d	<i>C. laurentii</i>	AY591353.2 ^b

^a SNCM, Spanish National Centre for Microbiology Yeast Collection.

^b GenBank accession number.

^c Strains included in HRM analysis.

^d ITS of rDNA obtained from GenBank.

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra Majadahonda-Pozuelo, Km 2, 28220 Majadahonda (Madrid), Spain. Phone: 34-91-8223661. Fax: 34-91-5097966. E-mail for Óscar Zaragoza: ozaragoza@isciii.es. E-mail for María J. Buitrago: buitrago@isciii.es.

[∇] Published ahead of print on 10 August 2011.

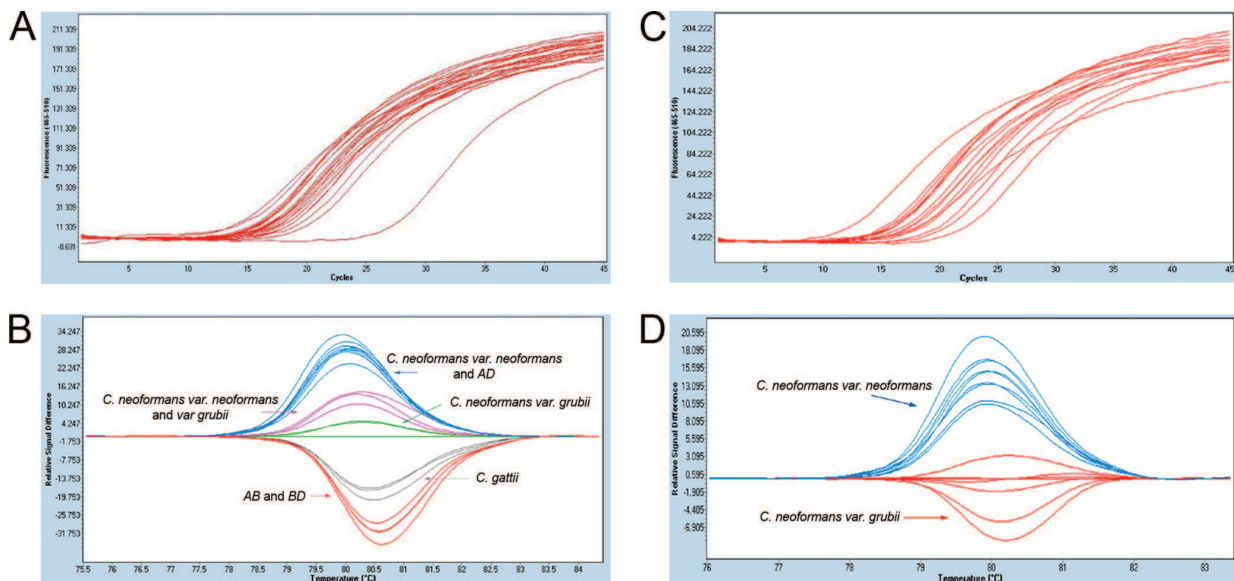


FIG. 2. Amplification curves in real-time PCR experiments and high-resolution melting analysis of *Cryptococcus* spp. (A and C) Amplification curves. (B and D) HRM analysis. (A and B) A total of 23 strains from *C. neoformans* var. *grubii* (4 strains), *C. neoformans* var. *neoformans* (5 strains), *C. gattii* (4 strains), and hybrids (10 strains) were analyzed. HRM groups were calculated based on the difference plots for the normalized and temperature-shifted melting curves for ITS PCR fragments. Base curve, H99 strain. Sensitivity, 0.26. (C and D) Analysis of 7 *C. neoformans* var. *grubii* strains and 9 *C. neoformans* var. *neoformans*/AD hybrids. HRM grouping was calculated as described for panel B, except for sensitivity, which was adjusted at 0.15.

decreased to 0.15. Clustering obtained by HRM was compared with the PCR fragment sequence.

The DNA fragments amplified by real-time PCR were sequenced using the ITS1 (23) and ITS2-100 primers. Sequences were assembled and edited using the SeqMan II and EditSeq Lasergene software programs (DNASTar, Madison, WI). Sequences were aligned for cluster analysis using Infoquest FP software v.4.50 (Bio-Rad, Madrid, Spain). Other non-*C. neoformans*/non-*C. gattii* species (*Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus diffluens*, and *Cryptococcus albidus*) were also included in the analysis. The method used for tree constructions was the unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGMA). As shown in Fig. 1, and based on nucleotide changes in the DNA sequence, four different groups were obtained for the *C. neoformans*-*C. gattii* complex. Two groups corresponded to *C. neoformans* (*C. neoformans* var. *grubii* and *C. neoformans* var. *neoformans*), and two groups corresponded to *C. gattii*. We assumed that these two groups of *C. gattii* isolates corresponded to B and C serotypes, especially because all the strains previously identified as serotype B by serological and molecular methods were clustered together. Interestingly, AD hybrids had the same sequence as that of *C. neoformans* var. *neoformans* strains, and AB and BD hybrids had the same sequence as that of *C. gattii* serotype B. *Cryptococcus* non-*C. neoformans*/non-*C. gattii* species presented more nucleotide differences in this DNA region (Fig. 1).

We proceeded to investigate if the nucleotide differences could differentiate the varieties and species by melting analysis of the PCR products amplified by real-time PCR. For this purpose, we performed real-time PCR and further melting analysis using 23 strains, shown in Table 1. Except for one strain, the crossing point

(C_p) value was between cycles 15 and 18 in the real-time PCR (Fig. 2A). When we analyzed the melting profiles of the different PCR products using the melt curve genotyping analysis, we could not differentiate the varieties and species (data not shown), which suggests that these nucleotide differences do not have a strong influence on the melting temperature (T_m) of the DNA fragments. We then analyzed the fragments using HRM, which provides a potent method to identify single-nucleotide polymorphisms (SNPs). In the first HRM analysis using a sensitivity value of 0.26, we could discriminate *C. gattii* and *C. neoformans* species. HRM analysis yielded 5 groups using the H99 strain (a widely used *C. neoformans* var. *grubii* isolate) as a base curve. We could discriminate two groups in the *C. gattii* strains and 3 groups among the *C. neoformans* complex strains. The two groups obtained in the *C. gattii* strains correlated with the clustering based on the DNA sequence of the PCR fragments (B and presumably C serotypes). In agreement with the nucleotide differences detected in this region, AB and BD hybrids were correctly clustered with *C. gattii* serotype B strains. Concerning *C. neoformans*, we could not unequivocally differentiate between *C. neoformans* var. *grubii* and *C. neoformans* var. *neoformans* strains, since three groups were obtained (Fig. 2B). One of them contained two *C. neoformans* var. *grubii* strains and one *C. neoformans* var. *neoformans* strain.

We then modified our experiment to include more *C. neoformans* var. *grubii* strains and performed the PCR amplification and melting curve assays in the same way as described above, but in the HRM analysis, we used more restrictive conditions (sensitivity, 0.15). The C_p value was between cycles 15 and 18 in the real-time PCR (Fig. 2C). When we performed the HRM analysis establishing this more restrictive sensitivity, we were able to dif-

ferentiate between *C. neoformans* var. *grubii* and *C. neoformans* var. *neoformans* (Fig. 2D). AD hybrids and D strains could not be discriminated using this analysis, which is in agreement with the fact that the DNA sequences of the ITS100 regions are identical in these strains. We have also observed that for proper discrimination of the strains using HRM, the genomic DNA quality used for PCR is an important factor to obtain reliable results, as previously described (16).

It has been previously reported that the ITS region is suitable for the identification of *Cryptococcus neoformans* complex (12) with high sensitivity and specificity. We have demonstrated the use of HRM analysis for the discrimination between *C. neoformans* and *C. gattii* varieties, although this tool did not allow identification of hybrid strains. We conclude that HRM represents an easy and rapid tool for the identification of SNPs as previously described (16, 22) and that it is suitable for the early detection of the most clinically relevant serotypes and species from the *C. neoformans*-*C. gattii* complex.

We warmly thank Emily Cook for her careful reading and editing of the manuscript.

This work was supported by research project PI09/1791 from Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Instituto de Salud Carlos III and by grant SAF2008-03761 (O.Z.) from the Spanish Ministry of Science and Innovation. S.G. is supported by a research fellowship from the Fondo de Investigaciones Biomedicas of the Spanish Ministry of Science and Innovation (reference FI10/00464).

Regarding potential conflicts of interest, in the past 5 years, M.C.-E. has received grant support from Astellas Pharma, bioMérieux, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, Soria Melguizo SA, the European Union, the ALBAN program, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, the Spanish Health Research Fund, the Instituto de Salud Carlos III, the Ramon Areces Foundation, and the Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. In the past 5 years, J.L.R.-T. has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, Soria Melguizo SA, the European Union, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, the Spanish Health Research Fund, the Instituto de Salud Carlos III, the Ramon Areces Foundation, and the Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Mycognostica, Pfizer, and Schering Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough.

REFERENCES

- Bartlett, K., et al. 2011. The emergence of *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island and expansion in the Pacific Northwest, p. 313–325. In J. Heitman, T. R. Kozel, K. J. Kwon-Chung, J. R. Perfect, and A. Casadevall (ed.), *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington, DC.
- Bovers, M., F. Hagen, E. E. Kuramae, and T. Boekhout. 2008. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet. Biol.* **45**:400–421.
- Bovers, M., et al. 2008. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* hybrid. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:1105–1108.
- Bovers, M., et al. 2006. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.* **6**:599–607.
- Byrnes, E. J., and J. Heitman. 2009. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biol. Rep.* **1**:pii:62.
- Chaskes, S., S. Frases, M. Cammer, G. Gerfen, and A. Casadevall. 2008. Growth and pigment production on D-tryptophan medium by *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, and *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **46**:255–264.
- Curtis, J. L., et al. 1994. Experimental murine pulmonary cryptococcosis. Differences in pulmonary inflammation and lymphocyte recruitment induced by two encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. *Lab. Invest.* **71**:113–126.
- Diaz, M. R., T. Boekhout, B. Theelen, and J. W. Fell. 2000. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:535–545.
- Fraser, J. A., et al. 2005. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* **437**:1360–1364.
- Fyfe, M., et al. 2008. *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. *Can. Commun. Dis. Rep.* **34**:1–12.
- Govender, N., T. G. Mitchell, A. P. Litvitseva, and K. J. Miglia. 2011. Cryptococcosis in Africa, p. 269–285. In J. Heitman, T. R. Kozel, K. J. Kwon-Chung, J. R. Perfect, and A. Casadevall (ed.), *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington, DC.
- Katsu, M., et al. 2004. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Res.* **4**:377–388.
- Kwon-Chung, K. J. 1976. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **68**:821–833.
- Kwon-Chung, K. J., and A. Varma. 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.* **6**:574–587.
- Leal, A. L., J. Faganello, M. C. Bassanesi, and M. H. Vainstein. 2008. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Med. Mycol.* **46**:377–383.
- Levesque, S., S. Michaud, R. D. Arbeit, and E. H. Frost. 2011. High-resolution melting system to perform multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* **6**:e16167.
- Lortholary, O., et al. 2006. Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* **20**:2183–2191.
- Mitchell, T. G., E. Castañeda, K. Nielsen, B. Wanke, and M. S. Lazéra. 2011. Environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, p. 237–260. In J. Heitman, T. R. Kozel, K. J. Kwon-Chung, J. R. Perfect, and A. Casadevall (ed.), *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington, DC.
- Park, B. J., et al. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* **23**:525–530.
- Paschoal, R. C., et al. 2004. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **46**:203–207.
- Perfect, J. R., S. D. Lang, and D. T. Durack. 1980. Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. *Am. J. Pathol.* **101**:177–194.
- Reed, G. H., J. O. Kent, and C. T. Wittwer. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* **8**:597–608.
- Rodríguez-Tudela, J. L., et al. 2007. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**:435–440.
- Scorzetti, G., J. W. Fell, A. Fonseca, and A. Statzell-Tallman. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res.* **2**:495–517.
- Sidrim, J. J., et al. 2010. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can. J. Microbiol.* **56**:445–458.
- Tang, C. M., J. Cohen, T. Krausz, S. Van Noorden, and D. W. Holden. 1993. The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* **61**:1650–1656.
- Veron, V., S. Simon, D. Blanchet, and C. Aznar. 2009. Real-time polymerase chain reaction detection of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in human samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **65**:69–72.
- Viviani, M. A., et al. 2006. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS Yeast Res.* **6**:614–619.
- White, T. J., T. Burns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, NY.
- Wittwer, C. T., G. H. Reed, C. N. Gundry, J. G. Vandersteent, and R. J. Pryor. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem.* **49**:853–860.

4.2. Identificación molecular de especies del complejo *psilosis* mediante análisis de HRM basado en la región intergénica del DNA ribosómico IGS-1.

Desde la definición en 2005 del complejo de especies *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*) la epidemiología de estas especies ha cobrado importancia. La presencia de diferencias en cuanto a prevalencia, eficacia del tratamiento antifúngico y determinantes de virulencia entre las especies del complejo pone de manifiesto la necesidad de una identificación precisa. Aunque se dispone de un gran número de técnicas de identificación molecular, la mayoría son poco reproducibles, emplean marcadores filogenéticos con bajo poder de resolución o presentan escasa sensibilidad para poderse utilizar de forma rutinaria en laboratorios asistenciales. En este objetivo se ha demostrado la utilidad de la región IGS-1 del ADN ribosómico para la identificación de especies del complejo *psilosis* y el desarrollo de una metodología rápida de identificación mediante análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM) basada en esta región. Se analizaron las secuencias de la región ITS e IGS-1 del rADN de 30 cepas del complejo *psilosis* de la colección del Servicio de Micología incluyéndose como cepas de referencia *C. parapsilosis* ATCC22019, *C. orthopsilosis* ATCC96139 y *C. metapsilosis* ATCC96144. Aunque ambas regiones coinciden en la clasificación a nivel de especie, la divergencia en secuencia de la región IGS-1 es muy superior a la de la región ITS, convirtiéndola en un marcador filogenético alternativo a la ITS. La gran abundancia de homopolímeros en esta región dificulta su secuenciación y limita su uso en la rutina de identificación de un laboratorio. Sin embargo, el hecho de conocer la secuencia permitió el desarrollo de un método basado en HRM que puede ser incorporado a la rutina diagnóstica. Para ello, se diseñaron una pareja de cebadores dirigidos a la región IGS-1 que para amplificar un fragmento de 73 pb. Tras el proceso de amplificación, las curvas fueron normalizadas y todas las cepas se agruparon correctamente con un intervalo de confianza superior al 98%. Los resultados muestran que el análisis mediante HRM de la región IGS constituye una herramienta rápida y precisa de identificación de las especies estrechamente relacionadas que componen el complejo *psilosis*.



Medical Mycology, 2014, 00, 1–10

doi: 10.1093/mmy/myu009

Advance Access Publication Date: 0 2014

Original Article



Original Article

Ribosomic DNA intergenic spacer 1 region is useful when identifying *Candida parapsilosis* spp. complex based on high-resolution melting analysis

Sara Gago¹, Ana Alastruey-Izquierdo^{1,2}, Marco Marconi³,
 María José Buitrago¹, Arnaud Kerhornou⁴, Paul J. Kersey⁴,
 Emilia Mellado¹, Manuel Cuenca-Estrella¹, Juan Luis Rodríguez-Tudela¹
 and Isabel Cuesta^{3,*}

¹Mycology Service, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain, ²Spanish Network for Research on Infectious Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ³Bioinformatic Unit, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain and ⁴Protein and Nucleotide Database (PANDA) Group, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, United Kingdom

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: isabel.cuesta@isci.iii.es

Received 9 October 2013; Revised 15 January 2014; Accepted 2 February 2014

Abstract

The epidemiology of *Candida parapsilosis* and the closely related species *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* has changed in recent years, justify the need to identify this complex at the species level. In this study we investigate the intergenic spacer 1 (IGS1) of the ribosomal DNA (rDNA) to evaluate the utility of this gene region as a phylogenetic molecular marker and the suitability of a high-resolution melting (HRM) strategy based on this region for identification of members of the *C. parapsilosis* spp. complex. We sequenced the IGS1 and the internal transcribed spacer (ITS) regions of the rDNA from 33 *C. parapsilosis sensu lato* strains. Although both regions are useful in identifying species, comparative sequence analysis showed that the diversity in the IGS1 region was higher than in the ITS sequences. We also developed an HRM analysis that reliably identifies *C. parapsilosis* spp. complex based on the amplification of 70 bp in the IGS1 region. All isolates were correctly identified with a confidence interval >98%. Our results demonstrate that HRM analysis based on the IGS1 region is a powerful tool for distinguishing *C. parapsilosis* from cryptic species.

Key words: *Candida parapsilosis* complex, high-resolution melting, intergenic spacer 1.

Introduction

Infections due to *Candida parapsilosis* are among the most frequent cause of candidemia in critically ill patients and

newborns [1,2]. *Candida parapsilosis* has been isolated from healthcare workers' hands [3] and catheters of parenteral hyperalimentation devices, suggesting likely transmission routes [4].

In 1995, Lin et al. [5] described three genetically distinct groups of *C. parapsilosis* clinical isolates based on isoenzyme profiles and the internal transcribed spacer (ITS) sequences. Tavanti et al. [6], using multilocus sequence typing (MLST) analysis, proposed replacing the existing designations of *C. parapsilosis* groups II and III with two new species, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*.

Although results on the prevalence and antifungal susceptibility of *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* differ among authors [7–10], an increasing number of reports have noted the clinical importance of both species [11]. In fact, newly published data suggest that *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* show an increased susceptibility to echinocandins and a decreased susceptibility to azoles when compared with *C. parapsilosis* [8,12,13]. However, caspofungin was effective for the treatment of candidemia in experimental mouse models when caused by either cryptic species [14], while micafungin was only effective against *C. metapsilosis* [15].

Several molecular methods have been developed to differentiate the species within this complex, most of them based on DNA mapping techniques (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA; RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism; AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) or the sequence of single or multicopy genes such as the ITS [4–6,16–22]. The ITS region has been designated as the “gold standard” for molecular identification of fungal species [23]. However, it has been shown that this region is not always effective when distinguishing among closely related species because of the low rate of sequence divergence [24,25]. Although differences in the ITS region are great enough to discriminate among species of *C. parapsilosis* complex [6], they are based on a few nucleotides. Therefore, the study of other genes or regions would be of interest in order to provide a more robust phylogenetic analysis.

The intergenic spacer (IGS) of the rDNA is placed between tandem repeat transcription rDNA units. In some fungal groups, each repeat unit also has a separately transcribed coding gene for 5S rRNA [26]. The 5S rDNA gene divides the IGS into two smaller regions (IGS1 and IGS2), which makes polymerase chain reaction (PCR) amplification of this region easier. In fact, for some fungal species, the IGS region is one of the most suitable markers for elucidating inter- and intraspecies diversity [24,27,28].

Molecular methods based on real-time PCR (RT-PCR) are an alternative to sequencing. RT-PCR procedures based on high-resolution melting (HRM) analysis characterize PCR products on their melting curves. Changes in the nucleotide composition or in the sequence length can be detected due to the existence of fluorescent molecules that have the capability to saturate DNA [29]. This strategy has been described for the identification of other fungal species such as *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp. [30–32].

The aims of this study were to evaluate the usefulness of IGS1 rDNA as a phylogenetic molecular marker for species identification and to evaluate the suitability of an HRM strategy based on this region for the rapid and accurate identification of these three species.

Materials and methods

Strains

Thirty *C. parapsilosis sensu lato* (*s.l.*) species from the Spanish National Centre for Microbiology’s yeast collection were identified through the use of morphological and molecular methods. *Candida parapsilosis*, American Type Culture Collection (ATCC) 22019; *C. orthopsilosis*, ATCC96139; and *C. metapsilosis*, ATCC96144 were included as reference strains in this study. Clinical origins of the isolates were diverse, but all were recovered in Spain. Yeast strains and GenBank accession numbers for DNA sequences are listed in Table 1.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted using a phenol-chloroform method [33] and purified using Chroma SPIN TE 400 columns (Clontech Laboratories, Becton Dickinson, Madrid, Spain).

ITS sequences amplification

Yeasts were cultured in Sabouraud glucose agar for 24 h. One colony was suspended in 500 µl of distilled sterile water, and the DNA fragment comprising the ITS-1 and ITS-2 rDNA regions was amplified with primers ITS-1 (TC-CGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS-4 (TCCTCCGCT-TATTGATATGC), as previously described [7]. Primers were synthesized by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Reaction mixtures contained 0.5 µM of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1× PCR buffer I (Applied Biosystems, Madrid, Spain), 2.5 U AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems), and 5 µl of the colony suspension in a final volume of 50 µl. Samples were amplified in a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) using the following cycling parameters: an initial cycle of 2 min at 94°C followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 56°C, and 2 min at 72°C, with a final cycle of 5 min at 72°C. Reaction products were analyzed in a 0.8% agarose gel and purified with EXO-SAP IT (Affymetrix, Madrid, Spain). Sequencing reactions were performed using 2 µl from a sequencing kit (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction; Applied Biosystems), 1 µM of each primer (ITS1, ITS4), and 3 µl of the PCR product in a final volume of 10 µl. The nucleotide sequence of the ITS region from the rDNA was used as a reference in order to identify the three species.

Table 1. Isolates and reference strains used in this study.

Strain	Origin	Specie	IGS-1 length (bp)	IGS-1 GenBank ID	ITS length (bp)	ITS GenBank ID
ATCC 96144	Human hand	<i>Candida metapsilosis</i>	666	KF313156	451	KF313194
CNM-CL 4438	Blood culture	<i>C. metapsilosis</i>	574	KF313152	457	KF313187
CNM-CL 4638	Blood culture	<i>C. metapsilosis</i>	488	KF313157	458	KF313188
CNM-CL 4886	Blood culture	<i>C. metapsilosis</i>	474	KF313158	458	KF313189
CNM-CL 4926	Blood culture	<i>C. metapsilosis</i>	488	KF313159	458	KF313190
CNM-CL 5144	Blood culture	<i>C. metapsilosis</i>	565	KF313153	457	KF313191
CNM-CL 5221	Blood culture	<i>C. metapsilosis</i>	667	KF313154	447	KF313192
CNM-CL 8774	Blood culture	<i>C. metapsilosis</i>	665	KF313155	457	KF313216
ATCC 96139	Unknown	<i>C. orthopsilosis</i>	160	KF313177	437	KF313193
CNM-CL 6823	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	158	KF313175	440	KF313195
CNM-CL 7045	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	241	KF313176	437	KF313200
CNM-CL 7261	Unknown	<i>C. orthopsilosis</i>	161	KF313173	440	KF313200
CNM-CL 7270	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	240	KF313178	437	KF313204
CNM-CL 7716	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	349	KF313171	429	KF313208
CNM-CL 7778	Peritoneal fluid	<i>C. orthopsilosis</i>	164	KF313174	440	KF313209
CNM-CL 8066	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	165	KF313172	440	KF313210
CNM-CL 8157	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	240	KF313179	437	KF313211
CNM-CL 8273	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	235	KF313184	437	KF313212
CNM-CL 8282	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	233	KF313181	437	KF313213
CNM-CL 8292	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	234	KF313182	437	KF313214
CNM-CL 8601	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	233	KF313180	437	KF313215
CNM-CL 8840	Blood culture	<i>C. orthopsilosis</i>	238	KF313183	437	KF313217
ATCC 22019	Unknown	<i>C. parapsilosis</i>	607	KF313165	446	KF313185
CNM-CL 6886	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	605	KF313169	446	KF313196
CNM-CL 7000	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	607	KF313162	446	KF313197
CNM-CL 7036	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	607	KF313170	446	KF313198
CNM-CL 7038	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	607	KF313167	446	KF313199
CNM-CL 7054	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	592	KF313161	446	KF313201
CNM-CL 7113	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	602	KF313166	446	KF313218
CNM-CL 7146	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	606	KF313168	446	KF313202
CNM-CL 7491	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	597	KF313160	429	KF313205
CNM-CL 7625	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	608	KF313164	446	KF313206
CNM-CL 7034	Blood culture	<i>C. parapsilosis</i>	607	KF313163	446	KF313207

All the clinical strains, except for ATCC (T) strains, were isolated in Spain.

ATCC, American Type Culture Collection; CNM-CL, Spanish National Center for Microbiology's yeast collection; IGS-1, intergenic spacer 1; ITS, internal transcribed spacer; KF, .

Primer design for IGS1 region amplification

The complete large subunit ribosomal (LSU or 25S rRNA gene), small subunit ribosomal (or 18S rRNA gene), and IGS sequence located between both genes were downloaded from 104 fungal genomes available in public databases in August 2010 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). Complete rDNA sequences were aligned by MUSCLE (The EMBL-European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) [34], and the multiple sequence alignment was manually adjusted using Jalview software (The EMBL-European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) [35].

For partial amplification of the rDNA IGS (IGS1), primers placed at the 3' end of LSU gene and 5S rRNA genes were designed; primer LR12R (5' GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC 3') was located between bases 461187 and 461208 of the *Saccharomyces cerevisiae* 25S rRNA gene sequence (ref. NC_001144.5 complement

460923...464318, length 3396 bp); primer 5S3r (5' GGC-CATATCTASCAGAAAGCACCG 3') was placed in a conserved region of the 5S rRNA gene (bases 462091 to 462114 of the *S. cerevisiae* 5S rRNA gene sequence ref. NC_001144.5 459676...459796, length 121 bp). Primer LR12R was an extended version of the primer published by the Vilgalys Lab (<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>), which is based on consensus sequences of the LSU from fungi, plants, and other eukaryotes.

Amplification of the IGS1 region

Reactions were performed in 25 µl final volume PCR mix containing 1× buffer *Hot star* (Qiagen, Madrid, Spain), 0.5 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1 U of *Hot star* DNA polymerase (Qiagen), 0.5 µM of each primer

(LR12R and 5S3r), and 50 ng of DNA. The PCR amplification and sequencing steps were the same as those previously described for ITS sequence. For the amplicon sequencing process, an extra-primer (2S51f: 5' GTAGAG-TAGCCTTGTTG 3') was used.

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were conducted with MEGA software, version 5.1 [36]. Multiple sequence alignments were performed with MUSCLE software [34]. Phylogenetic inferences were made using the maximum parsimony method for ITS sequences or maximum likelihood method based on the Tamura–Nei nucleotide substitution model for IGS1 sequences and ITS sequences (see Supplementary Material for ITS analysis). A discrete gamma distribution was applied to model evolutionary rate differences among nucleotides. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. *Candida guilliermondii* NCPG-3099 was used as the outgroup in each phylogenetic tree. Pairwise similarity was performed using InfoQuest FP 4.5 software (Biorad, Madrid, Spain).

HRM protocol

A fragment of 70 bp regions in the IGS1 of *C. parapsilosis s.l.* strains was amplified by RT-PCR followed by HRM analysis. Primers psIIIGS1f (5' TGCGGGCGA-GAGCTTGC 3') and psIIIGS1r (5' CAATTTACCCG-GCACTC 3') were designed for this purpose. RT-PCR amplifications were carried out in the CFX 96 RT-PCR system (Bio-Rad, Madrid, Spain). Reactions were performed in a 20- μ L reaction mix that contained 1 \times Precision Melt super mix (Bio-Rad), 200 nm of each primer, and 50 ng of genomic DNA. The amplification protocol consisted of an initial denaturation step for 2 min at 95°C followed by 45 cycles under the following conditions: denaturation (10 s at 95°C), annealing (30 s at 56°C), and extension (30 s at 72°C). HRM curves were obtained by incubating the PCR products for 30 s at 95°C and for 1 min at 60°C. Curves were generated using Precision Melt analysis software (Bio-Rad).

The following strains were used for specificity assays: *C. albicans* (CNM-CL5719); *C. glabrata* (CNM-CL5533); *C. guilliermondii* (CNM-CL7127); *C. krusei* (CNM-CL7057); *Coccidioides posadasii* (CNM-CM2912); *Paracoccidioides brasiliensis* (CNM-CL2908); *Aspergillus fumigatus* (CNM-CM237); *Fusarium solani* (CNM-CM3035); *Scedosporium apiospermum* (CNM-CM3169); *Rhizopus oryzae* (CNM-CM3020); human DNA (Promega, Madrid, Spain); and *Lodderomyces elongisporus* (CNM-CL8161), a species closely related to *C. parapsilosis* complex.

Nucleotide sequence accession numbers

GenBank accession numbers for ITS sequences from all strains used in this work were as follows:

ATCC22019:KF313185,	NCPG3099:KF313186,
CNM-CL4438:KF313187,	CNM-CL4638:KF313188,
CNM-CL4886:KF313189,	CNM-CL4926:KF313190,
CNM-CL5144:KF313191,	CNM-CL5221:KF313192,
ATCC96139:KF313193,	ATCC96144:KF313194,
CNM-CL6823:KF313195,	CNM-CL6886:KF313196,
CNM-CL7000:KF313197,	CNM-CL7036:KF313198,
CNM-CL7038:KF313199,	CNM-CL7045:KF313200,
CNM-CL7054:KF313201,	CNM-CL7146:KF313202,
CNM-CL7261:KF313203,	CNM-CL7270:KF313204,
CNM-CL7491:KF313205,	CNM-CL7625:KF313206,
CNM-CL7034:KF313207,	CNM-CL7716:KF313208,
CNM-CL7778:KF313209,	CNM-CL8066:KF313210,
CNM-CL8157:KF313211,	CNM-CL8273:KF313212,
CNM-CL8282:KF313213,	CNM-CL8292:KF313214,
CNM-CL8601:KF313215,	CNM-CL8774:KF313216,
CNM-CL8840:KF313217,	CNM-CL7113:KF313218

GenBank accession numbers for IGS1 sequences from all strains used in this work were as follows:

NCPG3099:KF313151,	CNM-CL4438:KF313152,
CNM-CL5144:KF313153,	CNM-CL5221:KF313154,
CNM-CL8774:KF313155,	ATCC96144:KF313156,
CNM-CL4638:KF313157,	CNM-CL4886:KF313158,
CNM-CL4926:KF313159,	CNM-CL7491:KF313160,
CNM-CL7054:KF313161,	CNM-CL7000:KF313162,
CNM-CL7034:KF313163,	CNM-CL7625:KF313164,
ATCC22019:KF313165,	CNM-CL7113:KF313166,
CNM-CL7038:KF313167,	CNM-CL7146:KF313168,
CNM-CL6886:KF313169,	CNM-CL7036:KF313170,
CNM-CL7716:KF313171,	CNM-CL8066:KF313172,
CNM-CL7261:KF313173,	CNM-CL7778:KF313174,
CNM-CL6823:KF313175,	CNM-CL7045:KF313176,
ATCC96139:KF313177,	CNM-CL7270:KF313178,
CNM-CL8157:KF313179,	CNM-CL8601:KF313180,
CNM-CL8282:KF313181,	CNM-CL8292:KF313182,
CNM-CL8840:KF313183,	CNM-CL8273:KF313184.

Results

Species identification of *C. parapsilosis* complex

Thirty *C. parapsilosis s.l.* strains were identified as *C. parapsilosis* species complex based on morphological characteristics. The cryptic species, that is, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* were differentiated by their similarity with the ITS nucleotide sequences of the type strains.

Using the maximum parsimony method, phylogenetic analysis of the ITS region provided a well-supported

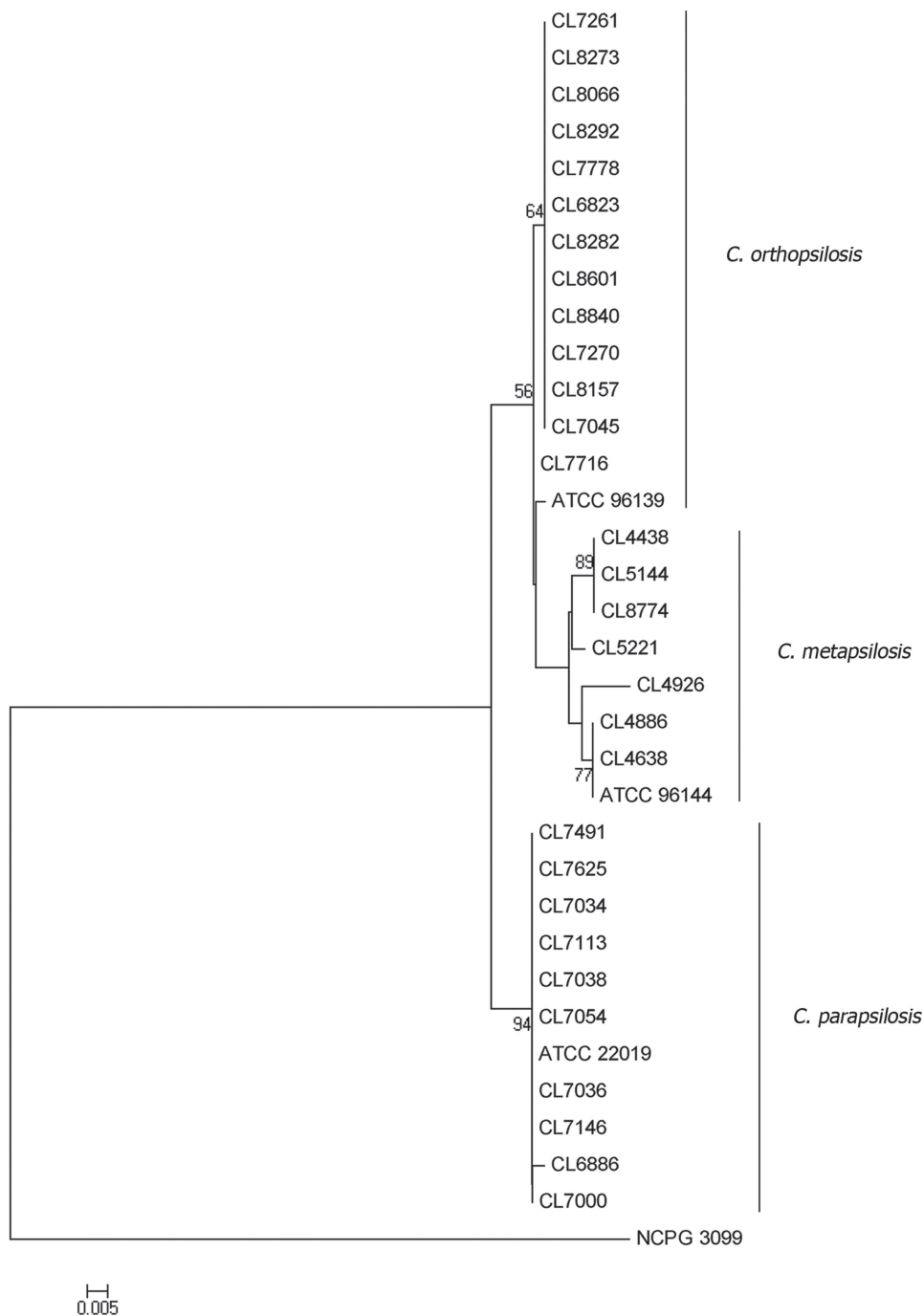


Figure 1. *Candida parapsilosis sensu lato* species based on parsimony analysis of the internal transcribed spacer region from the rDNA. The phylogenetic tree was computed using MEGA, version 5.0 (1000 bootstrap repetitions).

monophyletic species clade for *C. parapsilosis* spp. (bootstrap value 94%) but not for *C. orthopsilosis* or *C. metapsilosis*. This indicates weak statistical support for these species (Fig. 1), with pairwise sequence similarity percentages for ITS of 98.16% (*C. parapsilosis* vs. *C. orthopsilosis*), 95.90% (*C. parapsilosis* vs. *C. metapsilosis*), and 95.64%

(*C. orthopsilosis* vs. *C. metapsilosis*). Nucleotide sequences and length of the ITS region were similar for all isolates of each species (Table 1). The percentages of intraspecies identity based on the ITS sequences were 98.97% for *C. metapsilosis*, 99.11% for *C. orthopsilosis*, and 98.73% for *C. parapsilosis*. Phylogenetic analysis of the ITS region

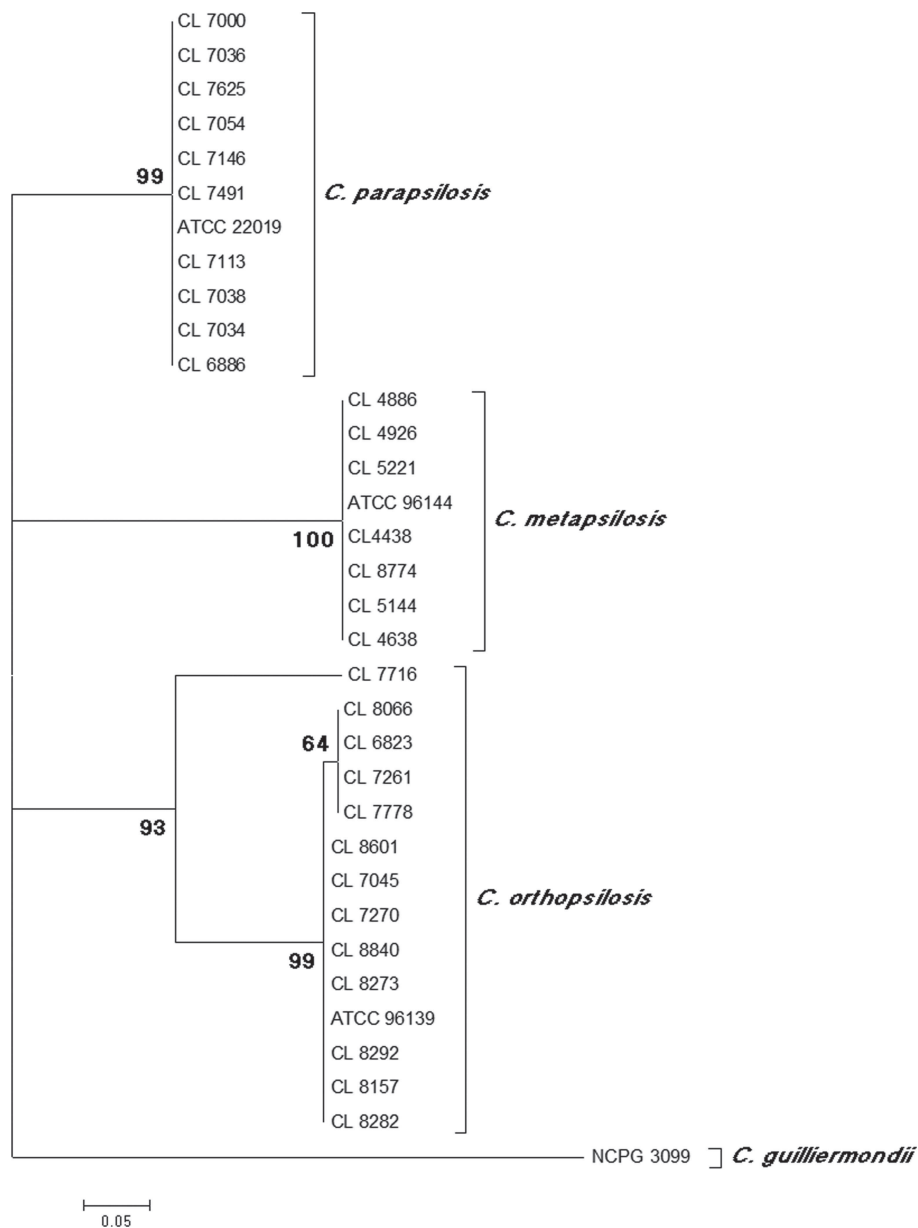


Figure 2. *Candida parapsilosis sensu lato* species based on maximum likelihood of the intergenic spacer 1 region from the rDNA. The phylogenetic tree was computed using MEGA, version 5.0 (1000 bootstrap repetitions).

using the maximum likelihood method was also not effective in differentiating between *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* (Supplementary Fig. 1).

The IGS1 region was also amplified by PCR, resulting in a clear single amplicon. Length variations in the IGS1 among the three species were observed by agarose electrophoresis and confirmed by differences in their nucleotide composition and sequence size (Table 1). Although the IGS1 length within *C. orthopsilosis* strains varied from 160 bp to 350 bp, *C. parapsilosis* and *C. metapsilosis* strains showed

only minor intraspecies differences. Pairwise sequence similarity percentages among species were 44.61% (*C. metapsilosis* vs. *C. orthopsilosis*), 38% (*C. metapsilosis* vs. *C. parapsilosis*), and 50% (*C. orthopsilosis* vs. *C. parapsilosis*). The percentages of intraspecies identity derived from multiple alignment of the IGS1 region were 92.91% for *C. metapsilosis*, 95.79% for *C. orthopsilosis*, and 97.33% for *C. parapsilosis*.

The phylogenetic tree based on the IGS1 sequence is shown in Figure 2. All strains belonging to the same species

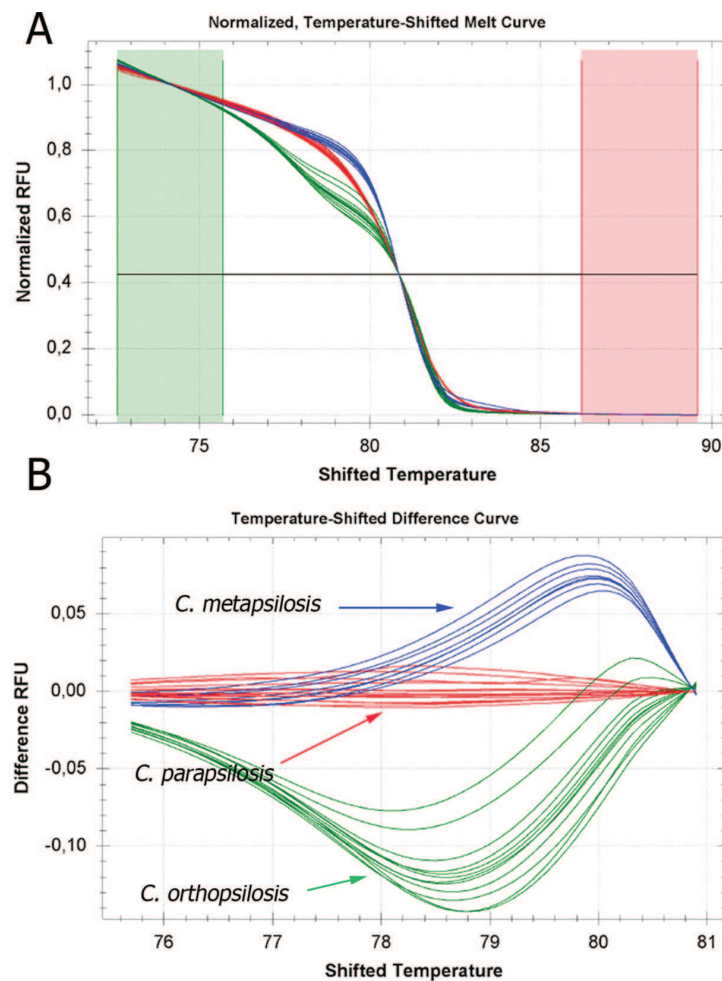


Figure 3. (A) Normalized and (B) temperature-shifted curves for high-resolution melting analysis of *Candida parapsilosis* complex based on intergenic spacer 1 region from the rDNA. Base curve, *C. parapsilosis* strains. RFU, relative fluorescence units. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

formed a monophyletic group supported by bootstrap values >93%. *Candida orthopsilosis* formed a monophyletic group that was divided into two subclades (bootstrap 93%), that is, one represented only by CNM-CL7716 and the other including all other strains. The strain CNM-CL7716 showed a 65.83% identity with the *C. orthopsilosis* type strain.

IGS-HRM analysis

RT-PCR based on HRM analysis was designed to amplify a fragment of 70 bp in the IGS1 of *C. parapsilosis* s.l., the crossing point was ~12 for all strains. For HRM analysis, melting curve data were manually adjusted and fluorescence normalized; a major melting shoulder (between 72.6°C and 75.7°C) and a smaller shoulder (between 86.2°C and 89.6°C) were defined. The threshold was kept in 0.15 when the height of the temperature shift bar was 0.42 and sensitivity for cluster detection was 50 (Fig. 3). The assay proved

to be 100% specific since species that do not belong to the *psilosis* complex were either not amplified or, when an amplification product was obtained, were not grouped with the strains of the *psilosis* complex. Thus, although *Lodderomyces elongisporus* was amplified with the HRM strategy, the strain was classified in a group that was different from the *psilosis* species with a confidence interval of 100% (data not shown). Furthermore, the strain CNM-CL7716 was grouped with the other *C. orthopsilosis* strains since primers for the HRM strategy were designed in a conserved region for all the strains analyzed.

Discussion

We investigated whether the IGS1 region of the rDNA could be used to identify *C. parapsilosis* and cryptic species. We also investigated its application as a target region for a highly sensitive RT-PCR protocol.

Candida parapsilosis sensu stricto is the second or third most common cause of candidemia worldwide [9,37,38]. Although new data suggest *C. orthopsilosis* is the fifth most common cause of candidemia in Spain, not *C. krusei* [39], other studies have shown the incidence of *C. parapsilosis* cryptic species to be lower, which could be related to climatic and socioeconomic conditions [12,13].

Although molecular identification of *C. parapsilosis s.l.* has been performed using the ITS region of the rDNA, our study results show that phylogenetic analysis inferred from this region is not as well supported as when the IGS region is used. As with the ITS regions, the IGS1 region belongs to the rDNA region that consists of hundreds of copies repeated in tandem. The IGS sequence has been used for a variety of intra- and interspecies fungal population studies, including studies of *S. cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, and *Trichosporon* spp. [24,25,27].

Very low intraspecimen variation in the IGS1 among paralogous copies for each strain was determined by Sanger sequencing of the three species. This fact has also been observed in *C. guilliermondii* [unpublished data, Cuesta I] and in *Penicillium marneffei* [28]. A concerted evolution model could explain these results, where homogenization is faster and very efficient and differences among the repeat units can finally disappear. This model of evolution has also been proposed for the rDNA cassette in other fungal species such as *Ashbya gossypii*, *S. paradoxus*, *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, and *C. neoformans* [40,41]. Moreover, the IGS1 sequence analysis reveals that the level of interspecies sequence dissimilarity is higher in this region than in the ITS region, although we differentiated some conserved motif such as transcription stop site for RNA polymerase III [42]. Slight differences in the IGS1 length for *C. parapsilosis* and *C. metapsilosis* observed in this study could be due to polymerase slippage in polyAs stretch, while length discrepancies in this region for *C. orthopsilosis* could be due to an ongoing evolutionary process. This last hypothesis is supported by others who have described *C. orthopsilosis* as the most heterogeneous of the *psilosis* species [16,43], which could be related to sexual and parasexual reproduction [44,45].

The discriminatory power of the IGS region to define *C. parapsilosis* species by PCR fingerprinting methods has been reported [17], even though the sequence of the IGS1 region has not been previously described. The results of our study have shown that although *C. orthopsilosis* is a well-supported group by IGS1 analysis, a subgroup that could be related to the existence of a fourth *psilosis* group member can also be defined. Sai et al. [45] observed that most of the *C. orthopsilosis* strains fall into two genetically distinguishable groups based on ITS sequence and mating type locus analysis. Recently, findings on the *C. orthopsilosis* genome

[46] and the sequence analysis of the ITS, mtDNA, and mtDNA restriction enzyme profiles [47] also suggest the existence of two *C. orthopsilosis* subtypes. However, other more diverse genes (eg, inteins) [48] and *C. orthopsilosis* strains should be analyzed to determine if the genetic differences are great enough to support branding a new species.

Candida parapsilosis complex identification based on the IGS1 sequence is problematic due to polyAs stretch, which makes it difficult to obtain sequences and requires development of other approaches. In this study, we propose a faster and cheaper real-time protocol followed by HRM analysis for *C. parapsilosis* spp. complex identification based on differences in the IGS1 sequence. Strains were plotted with a confidence interval >98% according to differences in length and sequence in the target region. Concordance between the IGS1 sequence and the HRM analysis was 100%. Another RT-PCR method for differentiating *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* was described by Garcia-Effron et al. [49]; they used a multiplex RT-PCR with molecular beacons aimed at the FKS1 gene, with high specificity and sensitivity. However, this procedure is more expensive compared with HRM. Moreover, the *SADH* gene has also been successfully used for an RT-PCR analysis based on conventional melting curves, although the differences in the melting curves are not as well defined as with HRM approaches [18]. Other protocols based on Taqman probes [50] are more cost effective than HRM analysis. Finally, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight technology described for identifying [51] and genotyping [52] *C. parapsilosis* spp. complex showed low discriminatory power for genotyping and an inability to detect mixed infections.

In conclusion, the IGS1 sequence seems to be a more suitable molecular marker for identifying *C. parapsilosis s.l.* species than the ITS region. HRM analysis based on the IGS1 sequence provides a rapid, less expensive, and easier RT-PCR protocol for identifying *psilosis* complex at a species level in a clinical laboratory.

Acknowledgments

We thank Frank Hodgkins for reading and editing the manuscript.

This work was supported as part of a research project of the Spanish Ministry of Science and Innovation (MPY1461/11). S. G. is supported by a research fellowship from the Fondo de Investigaciones Biomédicas, Spanish Ministry of Science and Innovation (FI10/00464). A. A. I. received a research contract from the Spanish Network for Research on Infectious Diseases (REIPI RD06/0008), supported by Plan Nacional de I+D+i 2008–2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, and Spanish Network for Research on Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) and cofinanced by the European Development Regional Fund, A Way to Achieve Europe, ERDF.

Declaration of interest

J. L. R.-T. has received grant support from Astellas Pharma, Gilead Sciences, MSD, Pfizer, ScheringPlough, Soria Melguizo S.A., the European Union, Spanish Agency for International Cooperation, Spanish Ministry of Culture and Education, Spanish Health Research Fund, Instituto de Salud Carlos III, Ramon Areces Foundation, and Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Pan American Health Organization, Gilead Sciences, MSD, Mycognostica, Pfizer, and ScheringPlough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, MSD, Pfizer, and Schering-Plough. M. C.-E. has received grant support from Astellas Pharma, bioMérieux, Gilead Sciences, MSD, Pfizer, ScheringPlough, Soria Melguizo S.A., Ferrer International, the European Union, the ALBAN Program (Becas de Alto Nivel para América Latina), Spanish Agency for International Cooperation, Spanish Ministry of Culture and Education, Spanish Health Research Fund, Instituto de Salud Carlos III, Ramon Areces Foundation, and Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Pan American Health Organization, Gilead Sciences, MSD, Pfizer, Astellas, and Schering-Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, MSD, Pfizer, Astellas, and Schering-Plough. All other authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

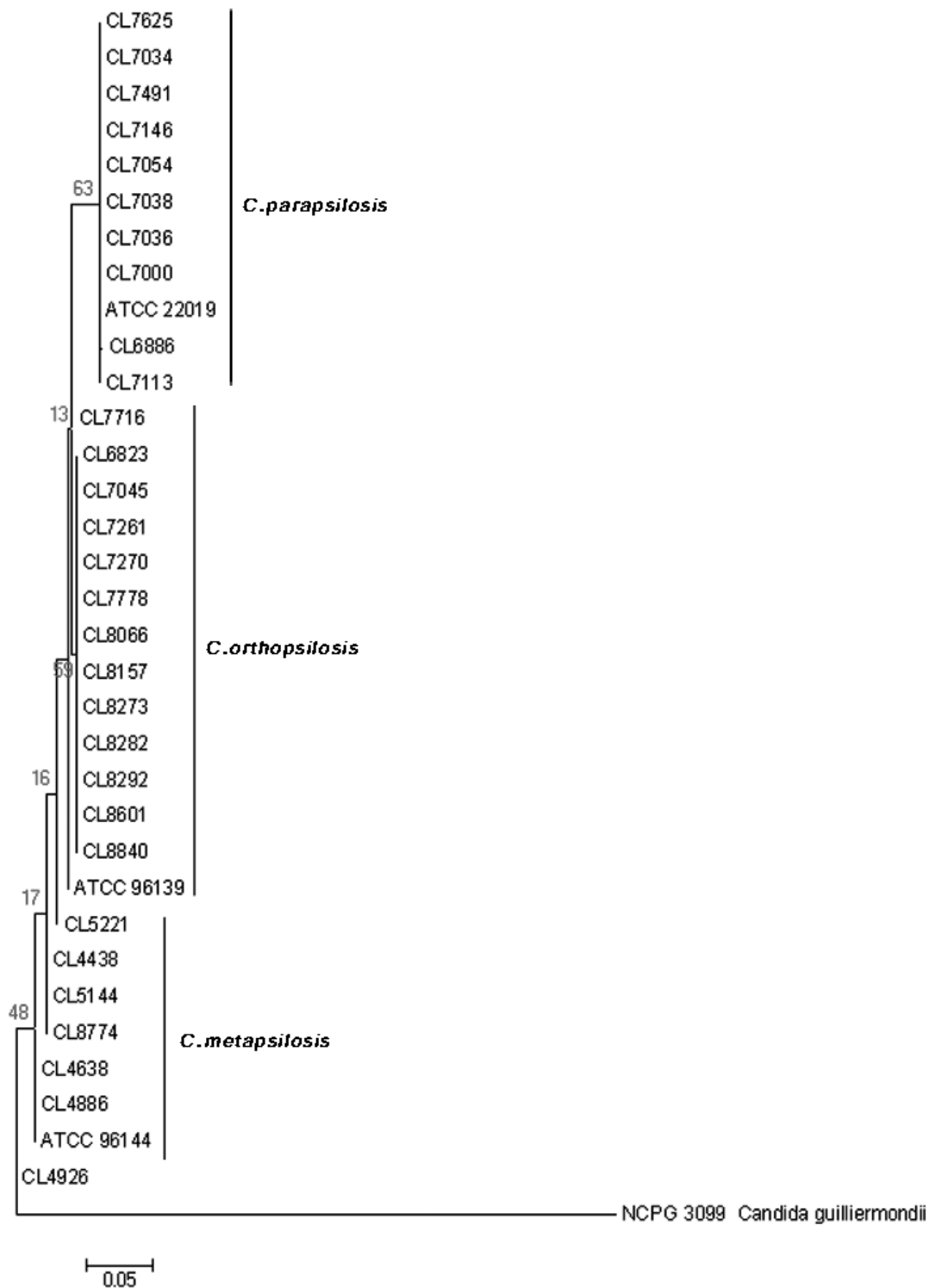
Supporting information

Supplementary material is available at *Medical Mycology* online (<http://www.mmy.oxfordjournals.org/>).

References

- Clerihew L, Lamagni TL, Brocklehurst P, McGuire W. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; **92**: F127–F129.
- Horasan E, Ersöz G, Kurt A, Karaçorlu S, Kaya A. Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in critical care units: a 6-years study. *Mycopathologia* 2012; **170**: 263–268.
- Munoz P, Burillo A, Bouza E. Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2001; **7**: 38–45.
- Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 452–456.
- Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 1815–1821.
- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 284–292.
- Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D et al. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1506–1509.
- Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 3435–3442.
- Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2659–2664.
- Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 2392–2397.
- van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* 2009; **35**: 283–309.
- Canton E, Espinel-Ingroff A, Peman J, del Castillo L. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2194–2197.
- Canton E, Peman J, Quindos G et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5590–5596.
- Szilagy J, Földi R, Gestzelyi R et al. Comparison of the kidney fungal burden in experimental disseminated candidiasis by species of the *Candida parapsilosis* complex treated with fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a temporarily neutropenic murine model. *Chemotherapy* 2012; **58**: 159–164.
- Spreghini E, Orlando F, Tavanti A et al. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2195–2202.
- Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan ZU. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol* 2009; **58**: 745–752.
- Cornet M, Sendid B, Fradin C et al. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *J Mol Diagn* 2011; **13**: 12–22.
- Hays C, Duhamel C, Cattoir V, Bonhomme J. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol* 2011; **60**: 477–480.
- Iida S, Imai T, Oguri T et al. Genetic diversity of the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S rRNA genes among the clinical isolates of *Candida parapsilosis* in Brazil and Japan. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2005; **46**: 133–137.
- Mirhendi H, Bruun B, Schonheyder HC et al. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol* 2010; **59**: 414–420.
- Tavanti A, Hensgens LA, Mogavero S et al. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiol* 2010; **10**: 203.
- Van Asbeck EC, Clemons KV, Markham AN, Stevens DA, *Candida parapsilosis* Global Epidemiology Group. Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida parapsilosis*. *Scand J Infect Dis* 2008; **40**: 827–834.

23. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 6241–6246.
24. Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 1826–1830.
25. Sugita T, Takeo K, Hama K et al. DNA sequence diversity of intergenic spacer I region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. *Med Mycol* 2005; **43**: 21–26.
26. Hillis M, Dixon M. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol* 1991; **66**: 411–453.
27. Diaz MR, Boekhout T, Kiesling T, Fell JW. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* 2005; **5**: 1129–1140.
28. Mekha N, Sugita T, Makimura K et al. The intergenic spacer region of the ribosomal RNA gene of *Penicillium marneffeii* shows almost no DNA sequence diversity. *Microbiol Immunol* 2010; **54**: 714–716.
29. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; **10**: 219–240.
30. Arancia S, Sandini S, de Bernardis F, Fortini D. Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **69**: 283–285.
31. Gago S, Zaragoza O, Cuesta I et al. High-resolution melting analysis for identification of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* complex. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 3663–3666.
32. Somogyvari F, Horvath A, Serly J et al. Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. *In Vivo* 2012; **26**: 979–983.
33. Tang CM, Cohen J, Krausz T, Van NS, Holden DW. The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 1993; **61**: 1650–1656.
34. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 2004; **5**: 113.
35. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1189–1191.
36. Tamura K, Peterson D, Peterson N et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; **28**: 2731–2739.
37. Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1681–1685.
38. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **74**: 323–331.
39. Pemán J, Cantón E, Quindós G et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1181–1187.
40. Ganley AR, Hayashi K, Horiuchi T, Kobayashi T. Identifying gene-independent noncoding functional elements in the yeast ribosomal DNA by phylogenetic footprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 11787–11792.
41. Ganley AR, Kobayashi T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res* 2007; **17**: 184–191.
42. Bartholomew B, Durkovich D, Kassavetis GA, Geiduschek EP. Orientation and topography of RNA polymerase-III in transcription complexes. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 942–952.
43. van Asbeck E, Clemons K, Markham A, Stevens DA. Correlation of restriction fragment length polymorphism genotyping with internal transcribed spacer sequence, randomly amplified polymorphic DNA and multilocus sequence groupings for *Candida parapsilosis*. *Mycoses* 2009; **56**: 493–498.
44. Hensgens L, Tavanti A, Mogavero S, Ghelardi E, Senesi S. AFLP genotyping of *Candida metapsilosis* clinical isolates: evidence for recombination. *Fungal Genet Biol* 2009; **46**: 750–758.
45. Sai S, Holland LM, McGee CF, Lynch DB, Butler G. Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. *Eukaryot Cell* 2011; **10**: 578–587.
46. Riccombeni A, Vidanes G, Proux-Wera E, Wolfe KH, Butler G. Sequence and analysis of the genome of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis*. *PLoS One* 2012; **7**: e35750.
47. Valach M, Pryszcz L, Tomaska L et al. Mitochondrial genome variability within the *Candida parapsilosis* species complex. *Mitochondrion* 2012; **12**: 514–519.
48. Prandini TH, Theodoro RC, Bruder-Nascimento AC, Scheel CM, Bagagli E. Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 2830–2836.
49. Garcia-Effron G, Canton E, Peman J et al. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis* sensu lato species. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 3257–3261.
50. Souza AC, Ferreira RC, Goncalves SS et al. Accurate identification of *Candida parapsilosis* (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 2310–2314.
51. Quiles-Melero I, Garcia-Rodriguez J, Gomez-Lopez A, Mingorance J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur J Clin Microbiol* 2012; **31**: 67–71.
52. Pulcrano G, Roscetto E, Iula V et al. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *Eur J Clin Microbiol* 2012; **31**: 2919–2928.



SUPPLEMENTAL FIGURE:

Analysis of the ITS region for all the *C. parapsilosis* s. l. strains by Maximum likelihood with 1000 bootstrap repetition

4.3. Tipado molecular en *Candida albicans* mediante análisis HRM

Las infecciones recurrentes debidas a *Candida albicans* son frecuentes en procesos de vaginitis o candidosis orofaríngea. Además, en la mayoría de los casos todos los episodios se deben a cepas clonales que sufren procesos de microevolución. Una de las técnicas de tipificación más empleadas en la actualidad es el análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar. Aunque la técnica presenta gran poder de discriminación y reproducibilidad, el coste por determinación es elevado y se requiere de un equipamiento complejo. Por ello, se evaluó la utilidad de las técnicas de HRM para caracterizar tres regiones de microsatélites en nueve aislamientos de *C. albicans* de un paciente con candiduria recurrente. Se seleccionaron tres marcadores previamente descritos (HIS 3, EF 3 y CDC 3) y se analizaron mediante electroforesis capilar y HRM. En el análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar se incluyeron 20 cepas no relacionadas geográficamente como población control. Los electrogramas se resolvieron con el programa GenMapper 4.0. Para el análisis de HRM, como población control se seleccionaron 7 cepas que habían presentado perfiles diferentes mediante la metodología de electroforesis capilar. El poder de discriminación de los tres marcadores mediante electroforesis capilar fue de 0,92 siendo el marcador CDC 3 el que presentaba menor capacidad de discriminación. Las cepas del episodio de candiduria recurrente presentaron el mismo perfil y diferente al de la población control para los tres marcadores, de modo que para HIS 3 y CDC 3 eran homocigotas y heterocigotas para el marcador EF 3. En el análisis de HRM en todos los casos, salvo la cepa CNM-CL 7020 con el marcador CDC 3, las cepas procedentes del paciente se agruparon juntas a pesar de que el poder de discriminación de los tres marcadores fue menor (0,77). Mediante secuenciación se pudo comprobar que la cepa CNM-CL 7020 presentaba una inserción que no era capaz de discriminar la electroforesis capilar. Según ambos análisis, las cepas que causaron los episodios de candiduria recurrente están relacionadas genéticamente, por tanto el análisis de microsatélites mediante HRM es una técnica rápida y sencilla para establecer relaciones entre cepas de *C. albicans*.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Analysis of strain relatedness using High Resolution Melting in a case of recurrent candiduria

Sara Gago¹, Belen Lorenzo², Alicia Gomez-Lopez¹, Isabel Cuesta³, Manuel Cuenca-Estrella¹ and Maria J Buitrago^{1*}

Abstract

Background: Several genotyping protocols have been described to study *Candida albicans* strains with different sensitivity values. In this study we have analyzed the genetic relatedness and the antifungal susceptibility of several *Candida albicans* strains isolated from a patient who from suffered recurrent candiduria for a period of five years. Strains were genotyped using Microsatellite Length Polymorphism (MLP) with three microsatellite markers (HIS 3, EF 3 and CDC 3), and a new method based on high resolution melting (HRM) was developed to analyze the microsatellite region. This method was compared with the conventional technique that uses capillary electrophoresis.

Results: MICs of the isolates showed the existence of fluconazole susceptible and resistant strains. An inter-colony test using single concentration (8 and 16 mg/l) of fluconazole revealed the coexistence of both fluconazole susceptible and resistant strains. Both genotyping analysis methods showed that all the patient's isolates had a clonal origin. HRM analysis method developed was able to accurately establish strain relatedness and presented a discriminatory power of 0.77.

Conclusions: Although HRM analysis method presented a lower discriminatory power compared to methods based on capillary electrophoresis, it provided a more cost-effective and suitable alternative for genotyping *C. albicans* in a clinical laboratory.

Keywords: Candiduria, High resolution melting, Genotyping

Background

Candida albicans is a ubiquitous commensal in healthy individuals; it is, however, a very important opportunistic pathogen for immunologically weak and immunocompromised people [1]. Recurrent and/or persistent infections by *Candida* species are frequent, particularly in oropharyngeal and vaginal candidiasis, although it has also been described in urinary tract infections [2]. Studies describing recurrent infections have focused on determining the relatedness between colonizing and infective strains [3,4], as well as between successive infective strains [5-9]. It seems clear now that the majority of commensal and infecting populations of *C. albicans*

from the same individuals are clonal in origin but subsequently undergo microevolution at the site of colonization and through recurrent episodes of infection [5,10,11]. The microevolution of the strains is a frequent process in recurrent infections and it takes place in response to adaptive changes [9,12]. A recent work which examined the "in vitro" dynamics of *C. albicans* populations in the presence or absence of fluconazole has shown that mutations that lead to increased drug resistance appear frequently [13]. Others authors suggest that natural *C. albicans* populations comprise a mixture of closely related strain types [6].

Typing methods have been described as useful tools for the differentiation between strains isolated only once and those able to cause recurrent infections. Although several typing methods have been described for *C. albicans* (AFLP, RFLP-PCR or MLST), one of the most suitable is the fragment length analysis of microsatellites called Microsatellite Length

* Correspondence: buitrago@isci.es

¹Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra Majadahonda-Pozuelo, Km 2, Majadahonda, Madrid 28220, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Polymorphism (MLP). This technique has a high discriminatory power and reproducibility. MLP analysis has proved its efficacy and reproducibility in a large number of epidemiological studies [9,14-19]; however, this technique is not easy to use and the estimated cost per isolate remains high.

The High Resolution Melting (HRM) provides a faster and cheaper method for microsatellite fragment analysis. This technique uses fluorescent DNA binding dyes with improved saturation properties allowing a precise assessment of sequence variation based on DNA melting curves analysis [20,21]. The suitability of HRM to discriminate PCR products based on one nucleotide change has also been described. Some recent articles, focusing on the capacity of HRM to identify and genotype fungi, have been reported [15,22].

In this work, we developed a method based on HRM to assess the relatedness of strains in a clinical case of recurrent candiduria. The results were compared with the conventional MLP genotyping techniques. The isolates, recovered over a period of five years, additionally showed significant differences in their susceptibility to antifungal agents. Antifungal susceptibility test and selection of resistant population was performed.

Methods

Origin of the strains and clinical data from the patient

The strains were isolated from a 62 year old male with medullary sponge right kidney (Carchi-Ricci disease) and

recurrent reno-urethral lithiasis subjected to several lithotripsies. The patient was admitted in a Tertiary General Hospital (Hospital Virgen de la Concha, Zamora, Spain) diagnosed with right pyelonephritis caused by obstructive kidney stones. *C. albicans* was isolated in blood cultures and urocultures. The antifungal susceptibility profile showed that azoles and amphotericin B were active in vitro against this strain (CNM-CL-4929, Yeast Collection of the Spanish National Centre for Microbiology) as shown in Table 1.

Treatment with ciprofloxacin 400 mg/12 h and fluconazole iv 200 mg/12 h was started. After three days of treatment, as fever persisted and blood and urine cultures remained positive, fluconazole was replaced by amphotericin B lipid complex 200 mg/24 h iv and 100 mg every other day. Six days after admission, lithotripsy was performed and a double J stent was placed. He was discharged from hospital a month after admission. From 2003 to 2008, the patient suffered from several episodes of *Candida* infection and underwent multiple lithotripsies. He was treated with oral fluconazole (200 mg/12 h) several times. A total of 18 strains were isolated from urine and sent to the Mycology Reference Laboratory for identification and susceptibility testing (Table 1). In 2006 the susceptibility of one of the isolates (CNM-CL-6188) showed high MICs for fluconazole (>8 mg/l). Three months later, the patient was readmitted to the hospital and diagnosed with hydronephrosis and

Table 1 MICs values and isolation data of the clinical isolates used in this study

Strain	Isolate origin	Isolation data	AB	5FZ	FZ	IZ	VZ	PZ	CA	MC	AN	
CNM-CL-4929	Blood culture	02-28-2003	0.03	0.12	0.12	0.015	0.015	*	*	*	*	
L06/31	Urine	02-01-2006	0.12	0.12	0.5	0.015	0.015	0.015	0.03	0.03	0.03	
L06/32	Urine	02-01-2006	0.12	0.12	0.5	0.015	0.015	0.015	0.03	0.03	0.03	
CNM-CL-6188 [#]	Urine	08-18-2006	0.25	0.12	> 64	> 8	> 8	> 8	0.25	0.03	0.03	
L06/260	Urine	08-18-2006	0.06	0.12	8	1	0.12	1	0.03	0.03	0.03	
L06/349	Urine	11-07-2006	0.06	0.12	0.25	0.015	0.015	0.015	0.12	0.03	0.03	
L06/350	Urine	11-07-2006	0.06	0.12	0.25	0.015	0.015	0.015	0.12	0.03	0.03	
CNM-CL-6361 [#]	Urine	03-20-2006	0.25	0.12	> 64	> 8	> 8	> 8	0.25	0.03	0.03	#
CNM-CL-6373 [#]	Urine	04-16-2006	0.12	0.12	> 64	1	> 8	4	0.25	0.03	0.03	
L07/130	Urine	04-16-2006	0.12	128	16	16	16	16	0.25	0.03	0.03	
CNM-CL-6399 [#]	Urine	05-21-2007	0.25	0.12	> 64	> 8	> 8	> 8	0.25	0.03	0.03	#
CNM-CL-6431 [#]	Urine	06-13-2007	0.25	0.12	> 64	> 8	> 8	> 8	0.25	0.03	0.03	#
CNM-CL-6488 [#]	Urine	07-27-2007	0.12	0.12	0.25	0.015	0.015	0.015	0.25	0.03	0.03	#
L07/453	Urine	11-21-2007	0.03	0.12	0.12	0.015	0.015	0.015	0.12	0.03	0.03	
L07/454	Urine	11-21-2007	0.03	0.12	0.25	0.06	0.06	0.12	0.06	0.03	0.03	
CNM-CL-6714 [#]	Urine	03-07-2008	0.25	0.12	> 64	0.06	> 8	> 8	0.25	0.03	0.03	#
CNM-CL-7019 [#]	Urine	11-12-2008	0.12	0.12	2	0.12	0.015	0.06	0.25	0.03	0.03	#
CNM-CL-7020 [#]	Urine	11-12-2008	0.25	0.12	0.25	0.015	0.015	0.015	0.25	0.03	0.03	#

[#] Strains included in the genotyping analysis.

* No MICs data available.

CNM-CL Yeast Collection of the Spanish National Center for Microbiology.

kidney obstruction after the placement of a double J stent in the right kidney. The stent was removed and a percutaneous nephrostomy was performed. An initial treatment with caspofungin 70 mg iv and then 50 mg iv/24 h was established. Later, the patient was treated with amphotericin B lipid complex (11 days) and was subsequently put back on caspofungin until patient was discharged from the hospital. During the stay in the hospital, blood cultures were negative while urine cultures remained positive until the patient was treated with amphotericin B. The patient's isolates were controlled in an outpatient mode up to the end of 2008, at which time the patient went to another institution and no more samples were taken. The written informed consent was sought and obtained from the patient according to Spanish regulations at that date. The patient also signed his consent to the release of his clinical and personal information in a scientific publication.

Antifungal susceptibility testing

Antifungal susceptibilities were tested in vitro according to the EUCAST microdilution method (AFST-EUCAST, definitive document 7.1). Interpretative breakpoints proposed by EUCAST for fluconazole and voriconazole were used [23]. For the rest of the antifungal tested, the breakpoints proposed by Rodriguez-Tudela et al. were used [24]. The antifungal agents used were amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin, micafungin, and anidulafungin. Isolates were stored at -20°C until use.

Selection of resistant population

In February of 2011, the isolates available in our culture collection (Tables 1 and 2) were subcultured for genotyping studies. To analyze the probability of the coexistence of fluconazole resistant and susceptible populations in each isolate, we performed a screening assay based on a single-concentration fluconazole test [25]. The antifungal concentration used in this assay was selected on the basis of the MIC values previously obtained. The test of growth was performed in microplates containing RPMI 1640 medium supplemented with 2% glucose (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and a final fluconazole concentration of 8 and 16 mg/l. Ten colonies of each isolate were tested. For each colony, a suspension of 10^5 cfu/ml was prepared. Plates were inoculated with 0.1 ml from the cell suspension. A growth control was also included. The Optical Density (OD) at 530 nm was measured after 24 and 48 hours of incubation. The reduction of the OD below 50% compared to control was considered as susceptibility to fluconazole.

Genotyping studies

Nine representative strains isolated from the patient on different days were selected for performance of genotyping studies (Tables 1 and 3). The control population

Table 2 Intercolony fluconazole susceptibility in single concentration microdilution plates

Strain	No of colonies fluconazole resistant	
	8 mg /l	16 mg/l
CNM-CL-6188	2/10	1/10
CNM-CL-6361	5/10	4/10
CNM-CL-6373	9/10	9/10
CNM-CL-6399	10/10	4/10
CNM-CL-6431	2/10	2/10
CNM-CL-6488	0/10	0/10
CNM-CL-6714	4/10	4/10
CNM-CL-7019	0/10	0/10
CNM-CL-7020	0/10	0/10

CNM-CL Yeast Collection of the Spanish National Center for Microbiology.

consisted of 20 strains from patients geographically and temporally unrelated. Nineteen out of 20 isolates were from whole blood and the remaining isolate was from pleural fluid (Table 3). ATCC64548 and ATCC64550 *C. albicans* reference strains were also included in this study. All isolates were identified by physiological and morphological tests, including microscopic examination and biochemical tests. The identification was confirmed by sequence analysis of the ITS (internal transcribed spacer) region of the rDNA [26].

Yeast cells were grown for 24 hours in Sabouraud broth medium at 30°C . Genomic DNA was extracted using a phenol:chloroform method [27] followed by purification using Chroma SPIN + TE 400 columns according to the manufacturer's instructions (Clontech Laboratories, Becton Dickinson, Madrid, Spain).

Genotyping analysis of *C. albicans* was performed using MLP procedure with three different markers previously described, CDC 3 [28]; EF 3 [29] and HIS 3 [30]. The primers sequences used to amplify these markers were: CDC3 forward (5' CAGATGATTTTTTGTATGAGAAGAA3') and reverse (5' CAGTCACAAGATTTAAATGTTCAAG3'); EF3 forward (5' TTTCTCTTCCTTTTCATATAGAA3') and reverse (5' GGATTCCTACTAGCAGCAGACA3') and HIS3 forward (5' TGGCAAAAATGATATCCAA3') and reverse (5' TACTACTATGCCCAAAACACA 3').

MLP analysis using capillary electrophoresis was modified from Botterel et al. [14]. Alleles were amplified in a multiplex PCR in a 50 μl final volume containing 20 ng DNA, 1X PCR-Buffer II (Applied Biosystems, Madrid, Spain), 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 5 mM of MgCl_2 , and 0.15 μM of each primer and 1U of AmpliTaq Polymerase (Applied Biosystems).

Sense CDC3 primer was labelled with 4, 7, 2', 4', 5', 7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX), EF3 antisense primer with 6-carboxyfluorescein (FAM) and HIS 3

Table 3 Microsatellite length (bp) for the three microsatellite markers using capillary electrophoresis

Strain	Isolate origin	Length (bp) determined by PCR analysis of microsatellite markers:		
		CDC 3	EF 3	HIS 3
CNM-CL-7426 ^a	Whole blood	117/125	125/125	162/186
CNM-CL-7449 ^a	Whole blood	117/125	125/125	162/190
CNM-CL-7470 ^a	Whole blood	117/125	120/120	162/227
CNM-CL-7471 ^a	Whole blood	117/117	130/130	162/162
CNM-CL-7478 ^a	Whole blood	117/125	120/120	202/202
CNM-CL-7484 ^a	Whole blood	125/125	125/125	162/190
CNM-CL-7498 ^a	Whole blood	125/129	130/139	149/166
CNM-CL-7499 ^a	Whole blood	117/129	130/139	154/154
CNM-CL-7503 ^a	Whole blood	117/117	126/138	153/182
CNM-CL-7504 ^a	Whole blood	117/117	124/130	149/166
CNM-CL-7513 ^a	Whole blood	121/125	124/137	158/158
CNM-CL-7617 ^a	Whole blood	117/117	124/130	313/313
CNM-CL-7624 ^a	Whole blood	117/117	126/138	153/153
CNM-CL-7620 ^a	Whole blood	117/125	120/120	162/210
CNM-CL-7640 ^a	Whole blood	125/129	130/137	149/166
CNM-CL-7643 ^a	Pleural fluid	117/117	124/130	149/166
CNM-CL-7683 ^a	Whole blood	117/125	120/129	162/210
CNM-CL-7694 ^a	Whole blood	117/129	130/139	148/153
CNM-CL-7705 ^a	Whole blood	117/117	124/130	—/—
CNM-CL-7712 ^a	Whole blood	117/125	120/129	162/210
ATCC64548 ^a	Whole blood	113/113	124/124	162/162
ATCC64550 ^a	Whole blood	117/125	120/129	162/178
CNM-CL-6188 ^b	Urine	121/121	127/129	153/153
CNM-CL-6361 ^b	Urine	121/121	127/129	153/153
CNM-CL-6373 ^b	Urine	121/121	127/129	153/153
CNM-CL-6399 ^b	Urine	121/121	127/129	153/153
CNM-CL-6431 ^b	Urine	121/121	127/129	153/153
CNM-CL-6488 ^b	Urine	121/121	127/129	153/153
CNM-CL-6714 ^b	Urine	121/121	127/129	153/153
CNM-CL-7019 ^b	Urine	121/121	127/129	153/153
CNM-CL-7020 ^b	Urine	121/121	127/129	153/153

CNM-CL Yeast Collection of the Spanish National Center for Microbiology.

a: Control population.

b: strains from the case study included for genotyping studies.

sense primer was labelled with 2'-chloro-5'-fluoro-7',8'-fused phenyl-1.4-dichloro-6-carboxyfluorescein (NED). Primers were synthesized by Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

PCR reactions were performed in a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). The cycling conditions included a first step for preincubation (activation of the enzyme) and denaturation of the DNA template at 95°C during 5 minutes. Next steps consisted in an amplification program of 30 cycles as follow: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and

extension at 72°C for 1 min with a final extension step of 7 min at 72°C.

To assess the size of the fragments, 1 µl of the PCR products was added to 9 µl of Formamide Hi-Di (Applied Biosystems, Madrid, Spain) and 1 µl of the internal size standard ROX 500 (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Capillary electrophoresis was run using the ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Madrid, Spain) sequencer. Fragment size for the different alleles was calculated with GeneMapper version 3.0 (Applied Biosystems, Madrid, Spain).

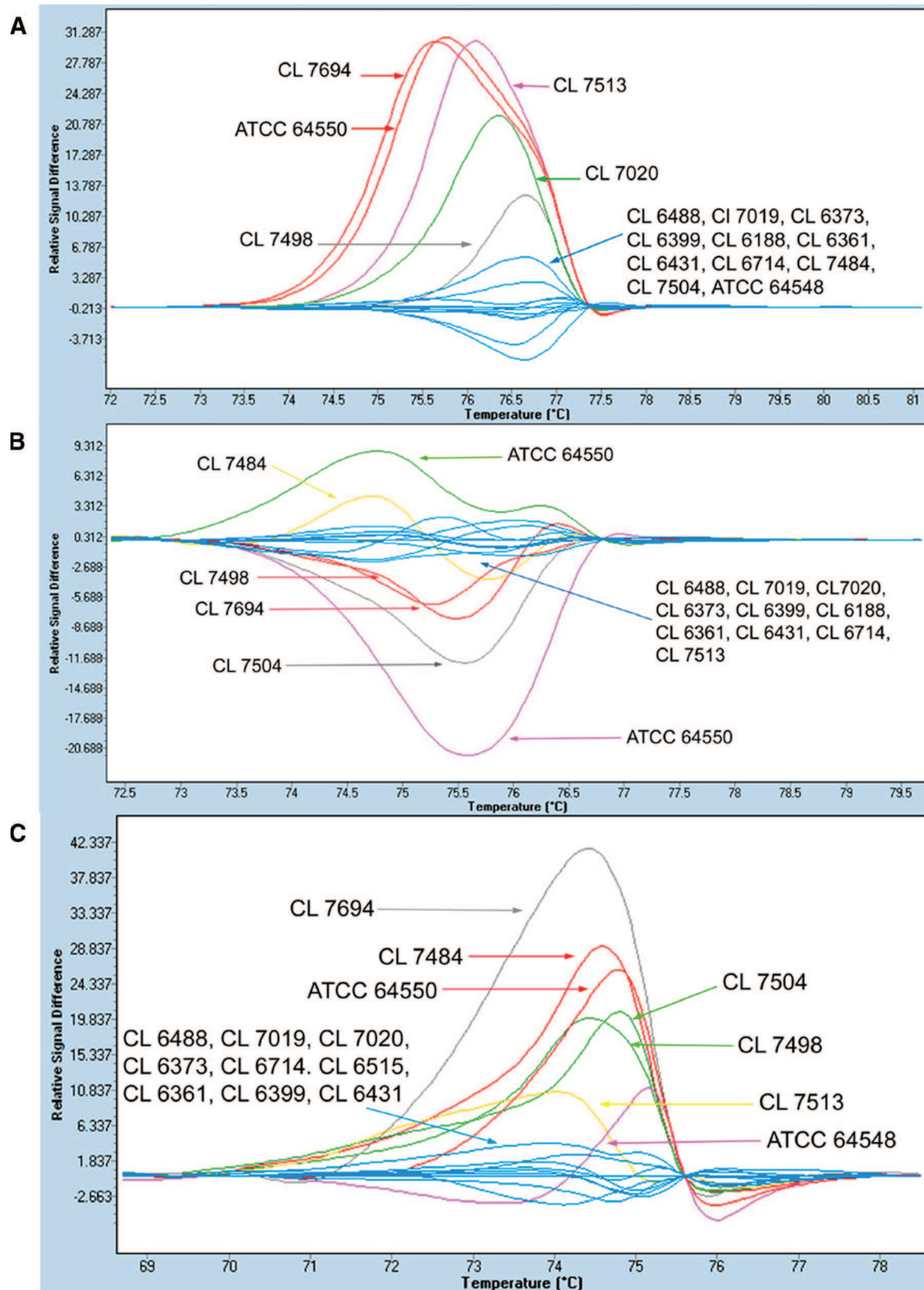


Figure 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 1 Difference plots for the normalized and temperature shifted melting curves for microsatellite from control population and patient strains. A) CDC3 marker; B) EF3 marker and C) HIS3 marker.

In addition, a HRM-based analysis was performed using singleplex PCRs with each pair of primers without any modification of the reaction conditions. Control population was selected based on MLP results. Strains included as control were: CL 7484, CL 7498, CL 7504, CL 7513, CL 7694, ATCC 64548 and ATCC 64550 (Figure 1). Seven different genotypes for the three markers were chosen (Figure 1).

After PCR, HRM analysis was performed in a LightCycler 480 system (Roche, Madrid, Spain). To obtain the HRM curves, 1 μ l of LightCycler[®] 480 ResoLight Dye (Roche, Madrid, Spain) was added to PCR products and the reactions were incubated at 95°C 1 min, followed by a renaturation step of 40°C for 1 min. Melting curves were generated by ramping from 65° to 95° at 0.02°C/s, 25 acquisitions/°C. HRM curves were plotted using the automated grouping option provided by the software and by manual editing for each microsatellite marker. Normalization conditions for each microsatellite marker are shown in Table 4.

For sequencing, amplicons were treated with ExoSap – IT (GE Health Care, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. Sequencing reactions were performed in a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). Sequences were analyzed in triplicate.

The numerical index of discriminatory power for each marker and for the multiplex analysis was calculated in both genotyping analysis using the Simpson biodiversity index (D) [31]. The percentage of heterozygosity has been calculated by the ratio number of heterozygous genotypes/ total number of genotypes.

Results

Antifungal susceptibility testing

Antifungal susceptibility results are shown in Table 1. At first, isolates were susceptible to all antifungal agents tested; however, in August 2006 an isolate showed an azole-resistant phenotype and subsequently isolates susceptible and resistant to azoles appeared at random. Between March 2006 and June 2007 all strains tested were azole-resistant but this pattern changed again between

July and November 2007. The latest azole resistant strain recovered was from March 2008.

Fluconazole resistance selection

Ten colonies of each of the nine isolates genotyped were tested for fluconazole resistance at 8 and 16 mg/l final concentration. From five out of the 9 strains we were able to select resistant and susceptible isolates. On the other hand, from one strain all colonies were resistant and from the remaining three strains all checked colonies were susceptible to fluconazole in a final concentration of 8 mg/l. When fluconazole concentration was increased to 16 mg/l, the number of resistant colonies was reduced (Table 2).

Genotyping studies

Microsatellite length genotyping

Microsatellite markers were used to genotype the nine strains recovered from the patient. Each PCR product was assigned to an allele [14] so each strain was characterized by 6 alleles that were differently coupled (Table 3). Strains from the patient showed the same microsatellite pattern for the three markers and they were different from the control population (Table 3). All the isolates recovered from the patient were homozygous for CDC 3 and HIS 3 markers while they showed a heterozygous genotype for EF 3 (Table 5).

The D value for EF3 was 0.86, similar to that previously reported [14,15], for CDC 3 it was 0.81, and for HIS 3 it was 0.87. The combination of three markers yielded a discriminatory power of 0.92 (Table 5).

Microsatellite HRM genotyping

When analysis by HRM was performed, isolates from the patient were grouped together for the three markers analyzed (Figure 1).

The analysis of marker CDC 3 showed that all homozygous strains, including those from the patient, were plotted in one group except for the CNM- CL 7020 strain (Figure 1A). Due to the unexpected result for CNM-CL7020, the PCR product was sequenced (6x

Table 4 High resolution melting conditions and discrimination power

HRM Marker	Pre-Melt T	Post-Melt T	Threshold/Sensitivity	DP
CDC 3	71.95-72.96	79.34-81.11	5.645/0.3	0.53
EF 3	70.8-72.62	78.46-79.71	5.645/0.3	0.62
HIS 3	68.65-69.82	77.42-78.56	5.645/0.3	0.68
Multiplex				0.77

Table 5 Characteristics of the microsatellite loci analyzed by capillary electrophoresis

Microsatellite Marker	No. of alleles	No. of genotypes	No. of heterozygotic genotypes	DP	% heterozygosity
CDC 3	5	8	4	0.81	50.00
EF 3	10	11	7	0.86	63.63
HIS 3	14	15	11	0.88	53.30
Multiplex				0.92	

sequence coverage) and a 3 bp insertion at 67 pb from the forward primer was found. Heterozygous strains were distributed in four groups according to their fragment length. The heterozygous strains CNM-CL 7694 and ATCC 64550 were plotted together although one of the alleles were different (Table 3). When we performed EF 3 fragments analysis by HRM, six different groups were plotted one of them contained strains from the patient while the control population was distributed into five groups according to its fragment size or whether they were homozygous or heterozygous (Figure 1B).

Finally, HRM analysis of the HIS3 marker showed six different groups. Strains from the patient were grouped together again. Strains in the control population were grouped based on their fragment size pattern (Figure 1C).

Discrimination power for CDC 3 marker was 0.53, for EF 3 it was 0.62 and for the HIS 3 marker it was 0.68. The combination of the three markers provided a DP value of 0.77 (Table 4).

Discussion

Typing methods have been described as useful tools for the differentiation between strains isolated only once and those able to cause recurrent infections. Several methods have been developed to analyze microevolution and structure of *C. albicans* species. Although MLST (MultiLocus Sequence Typing) has been chosen as the most discriminatory technique [5,32], several articles have recently pointed towards the suitability of MLP [14-16,29]. In this study, nine isolates from a case of recurrent urinary infection were genotyped using microsatellites and a new HRM analysis method. Antifungal susceptibility testing revealed that strains from the patient were susceptible and resistant in vitro to fluconazole in a random way. Microvariation between colonies due to exposure of *C. albicans* to azole antifungal agents has been widely described [10,16] and the need to perform intercolony assays has also been reported [25,33,34]. We performed an inter-colony test modified from Schoofs et al. [25] and we were able to prove the coexistence of colonies resistant and susceptible to azoles in a high number of the strains tested. The number of azole-resistant colonies was variable depending on azole concentration.

A genotyping method based on HRM analysis was developed taking into account previous works showing that if the number of genotypes is higher than seven, the

curve definition is not the best possible [35]. Based on that premise, for each marker we selected seven strains with different genotype, previously analysed by capillary electrophoresis. *C. albicans* microsatellites (CDC3, EF3 and HIS3) were amplified using LightCycler[®] 480 ResoLight as intercalating dye. When HRM analysis was performed, the isolates from the patient were plotted together and these results were consistent with those obtained by capillary electrophoresis. There was only one exception for the CDC3 marker where one strain (CNM-CL7020) was not grouped, as expected, with the other strains showing the same MLP genotype. The sequence of the fragment showed a 3 bp insertion that explained the melting differences. This fact supports previous works in which HRM allowed to identify changes in the sequence length and one nucleotide changes [36].

Although the calculated discrimination power was higher for the analysis using capillary electrophoresis than for HRM analysis (0.92 vs. 0.77) as previously reported [14]. The HRM analysis showed several advantages; it was a very simple and fast technique and results were obtained in 3 hours (including amplification), the interpretation of results was easy and the cost per sample was much lower than MLP genotyping due to this technique does not require sequencing equipment and the primers are not end-labelled. Our estimate is that the cost per sample using capillary electrophoresis is more than twice that of using HRM analysis. Furthermore, it can be used in a routine laboratory setting as it only requires real time PCR equipment. In this study, although we were not able to demonstrate the mechanism underlying the variability in the susceptibility to azoles in the strains tested, we were able to confirm that resistant and susceptible isolates were genetically closely related with an easy method to analyze microsatellites. The results highlight the need for more in-depth studies to be performed on these kinds of infections for an accurate and appropriate management thereof.

Conclusions

This method is a useful tool for performing a fast screening to establish relatedness between strains in outbreaks or surveillance studies in cases of recurrent or persistent infections. To our knowledge, this is the first study in which three microsatellite markers were analyzed by HRM by using seven strains with different

genotype as control population and reaching HRM resolution limits. Although HRM analysis method presented a lower degree of discrimination compared to other genotyping methods, it provided a more cost-effective and suitable alternative for genotyping *C. albicans* in a clinical laboratory.

Competing interest

In the past 5 years, M.C.E. has received grant support from Astellas Pharma, bioMerieux, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, Soria Melguizo SA, the European Union, the ALBAN program, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, The Spanish Health Research Fund, The Instituto de Salud Carlos III, The Ramon Areces Foundation, The Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. He has received remuneration for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough.

Authors' contributions

SG performed the genotyping studies, the analysis of the results and also participated in drafting the manuscript. BL participated in the collection of clinical data and strains from the patient. AG-L has been involved in the antifungal susceptibility testing. IC has made contributions to the analysis of the results. MC-E has been involved in drafting the manuscript and in the final approval of the version to be published following a critical review thereof. MJB was responsible for the original design of the study and participated in its further design and development as well as having been involved in drafting the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Research Projects from Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Instituto de Salud Carlos III (PI09/1791 and PI11/00412) and by the Spanish Network for Research on Infectious Diseases (REIPI RD06/0008/10). S. G. is supported by a research fellowship from the "Fondo de Investigaciones Biomédicas" of the Spanish Ministry of Science and Innovation (FI10/00464).

Author details

¹Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra Majadahonda-Pozuelo, Km 2, Majadahonda, Madrid 28220, Spain. ²Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de la Concha, Zamora, España. ³Unidad de Bioinformática, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Received: 23 January 2012 Accepted: 18 January 2013

Published: 23 January 2013

References

- Pappas PG: Invasive candidiasis. *Infect. Dis Clin North Am* 2006, **20**:485–506.
- Khatib R, Ayeni O, Riederer KM, Briški LE, Wilson FM: Strain relatedness in persistent and recurrent candiduria. *J Urol* 1998, **159**:2054–2056.
- Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, Schroppel K, Srikantha T, Galask R, Soll DR: Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol* 1995, **33**:1501–1509.
- Lockhart SR, Reed BD, Pierson CL, Soll DR: Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with "substrain shuffling": demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1, and CARE2. *J Clin Microbiol* 1996, **34**:767–777.
- Da Matta DA, Melo AS, Guimaraes T, Frade JP, Lott TJ, Colombo AL: Multilocus sequence typing of sequential *Candida albicans* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *Med Mycol* 2010, **48**:757–762.
- Jacobsen MD, Duncan AD, Bain J, Johnson EM, Naglik JR, Shaw DJ, Gow NA, Odds FC: Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. *FEMS Yeast Res* 2008, **8**:1334–1338.
- Odds FC, Davidson AD, Jacobsen MD, Tavanti A, Whyte JA, Kibbler CC, Ellis DH, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA: *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2006, **44**:3647–3658.
- Sabino R, Sampaio P, Carneiro C, Rosado L, Pais C: Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC Microbiol* 2011, **11**:180.
- Sampaio P, Gusmao L, Correia A, Alves C, Rodrigues AG, Pina-Vaz C, Amorim A, Pais C: New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. *J Clin Microbiol* 2005, **43**:3869–3876.
- Shin JH, Chae MJ, Song JW, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW: Changes in karyotype and azole susceptibility of sequential bloodstream isolates from patients with *Candida glabrata* candidemia. *J Clin Microbiol* 2007, **45**:2385–2391.
- Shin JH, Park MR, Song JW, Shin DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW: Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol* 2004, **42**:4025–4031.
- Sampaio P, Santos M, Correia A, Amaral FE, Chavez-Galarza J, Costa-de-Oliveira S, Castro AG, Pedrosa J, Pais C: Virulence attenuation of *Candida albicans* genetic variants isolated from a patient with a recurrent bloodstream infection. *PLoS One* 2010, **5**:e10155.
- Huang M, McClellan M, Berman J, Kao KC: Evolutionary dynamics of *Candida albicans* during in vitro evolution. *Eukaryot Cell* 2011, **10**:1413–1421.
- Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S: Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol* 2001, **39**:4076–4081.
- Costa JM, Garcia-Hermoso D, Olivi M, Cabaret O, Farrugia C, Lecellier G, Dromer F, Bretagne S: Genotyping of *Candida albicans* using length fragment and high-resolution melting analyses together with minisequencing of a polymorphic microsatellite locus. *J Microbiol Methods* 2010, **80**:306–309.
- Costa-de-Oliveira S, Sousa I, Correia A, Sampaio P, Pais C, Rodrigues AG, Pina-Vaz C: Genetic relatedness and antifungal susceptibility profile of *Candida albicans* isolates from fungaemia patients. *Med Mycol* 2011, **49**:248–252.
- Eloy O, Marque S, Botterel F, Stephan F, Costa JM, Lasserre V, Bretagne S: Uniform distribution of three *Candida albicans* microsatellite markers in two French ICU populations supports a lack of nosocomial cross-contamination. *BMC Infect Dis* 2006, **6**:162.
- García-Hermoso D, Cabaret O, Lecellier G, Desnos-Ollivier M, Hoinard D, Raoux D, Costa JM, Dromer F, Bretagne S: Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-Based typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2007, **45**:3958–3963.
- García-Hermoso D, MacCallum DM, Lott TJ, Sampaio P, Serna MJ, Grenouillet F, Klaassen CH, Bretagne S: Multicenter collaborative study for standardization of *Candida albicans* genotyping using a polymorphic microsatellite marker. *J Clin Microbiol* 2010, **48**:2578–2581.
- Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT: High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol* 2008, **85**:50–58.
- Erali M, Wittwer CT: High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* 2010, **50**:250–261.
- Arancia S, Sandini S, De Bernardis F, Fortini D: Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011, **69**:283–285.
- Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Fegeler W, Lass-Flörl C, Moore C, Richardson M, Sandven P, Velegri A, Verweij P: EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**:398–405.
- Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Lass-Flörl C: EUCAST Breakpoints for Antifungals. *Drugs News and Perspectives* 2010, **23**:93–97.
- Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Wouters L, Goossens H: Isolation of *Candida* species on media with and without added fluconazole reveals high variability in relative growth susceptibility phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**:1625–1635.
- Cendejas-Bueno E, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M: Identification of pathogenic rare yeast species in

- clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. *J Clin Microbiol* 2010, **48**:1895–1899.
27. Tang CM, Cohen J, Holden DW: An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol Microbiol* 1992, **6**:1663–1671.
 28. DiDomenico BJ, Brown NH, Lupisella J, Greene JR, Yanko M, Koltin Y: Homologs of the yeast neck filament associated genes: isolation and sequence analysis of *Candida albicans* CDC3 and CDC10. *Mol Gen Genet* 1994, **242**:689–698.
 29. Bretagne S, Costa JM, Besmond C, Carsique R, Calderone R: Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. *J Clin Microbiol* 1997, **35**:1777–1780.
 30. Magee BB, Koltin Y, Gorman JA, Magee PT: Assignment of cloned genes to the seven electrophoretically separated *Candida albicans* chromosomes. *Mol Cell Biol* 1988, **8**:4721–4726.
 31. Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988, **26**:2465–2466.
 32. Myoung Y, Shin JH, Lee JS, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW: Multilocus sequence typing for *Candida albicans* isolates from candidemic patients: comparison with Southern blot hybridization and pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Korean J Lab Med* 2011, **31**:107–114.
 33. Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG: Clinically significant azole cross-resistance in *Candida* isolates from HIV-positive patients with oral candidosis. *AIDS* 1997, **11**:1839–1844.
 34. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C: Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother* 1995, **35**:103–114.
 35. Mader E, Lukas B, Novak J: A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BMC Genet* 2008, **9**:69.
 36. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ: High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003, **49**:853–860.

doi:10.1186/1471-2180-13-13

Cite this article as: Gago et al.: Analysis of strain relatedness using High Resolution Melting in a case of recurrent candiduria. *BMC Microbiology* 2013 **13**:13.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5. DISCUSIÓN

La investigación en los laboratorios de referencia tiene entre sus objetivos principales el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico que sean transferibles al Sistema Nacional de Salud o que se puedan desarrollar comercialmente. En el ámbito de la micología médica, al contrario que en bacteriología o virología, el desarrollo de métodos de PCR diagnóstica es limitado y se centra principalmente en el diagnóstico de candidosis o aspergilosis invasora. En este contexto, se han desarrollado, estandarizado y validado técnicas de PCR en tiempo real para el diagnóstico e identificación de algunas de las infecciones fúngicas que conllevan una elevada mortalidad. Los ensayos descritos en esta tesis son imprescindibles para facilitar su posterior transferencia o desarrollo comercial para facilitar su uso en entornos donde estas infecciones tienen una incidencia elevada y esta tecnología no está disponible.

5.1. Detección de los hongos patógenos humanos que causan neumonía en el paciente inmunodeprimido mediante PCR en tiempo real en un solo tubo

Histoplasma capsulatum, *Cryptococcus neoformans* y *Pneumocystis jirovecii* son los principales patógenos causantes de la neumonía oportunista fúngica en individuos infectados por el VIH (Armstrong-James et al., 2014; Huang y Crothers, 2009). La sintomatología clínica y la radiología de estas infecciones es similar, confundiéndose entre sí y también con la tuberculosis que, generalmente, es la primera sospecha clínica (Denis y Lortholary, 2013; Rodríguez-Cerdeira et al., 2014). El proceso de diagnóstico diferencial cuando un paciente desarrolla sintomatología respiratoria aguda compatible con una neumonía fúngica, es complejo, largo y costoso. Con el desarrollo de esta PCR múltiple se puede obtener una respuesta rápida de la etiología del proceso.

La PCR en tiempo real en formato múltiple, desarrollada en este trabajo, está basada en sondas *molecular beacon* dirigidas a la región ITS del ADN ribosómico. Se eligieron este tipo de sondas por su elevada especificidad y baja fluorescencia residual (Espy et al., 2006). Debido a su compleja estructura, su diseño se realizó mediante un software especializado y utilizando la extensa base de datos de secuencias del Servicio de Micología mencionada en la introducción. Además, el uso de las sondas de tipo

Discusión

molecular beacon, facilita el diseño de ensayos en formato múltiple que no pueden realizarse con otras sondas menos estables como las sondas FRET o TaqMan (Espy et al., 2006).

Pneumocystis jirovecii se puede cultivar en líneas celulares, sin embargo la propagación del microorganismo de forma indefinida in vitro no se ha conseguido (Martínez et al., 2013). Por ello, los controles positivos se obtuvieron mediante clonación en un plásmido comercial. El inserto clonado fue el producto de amplificación de la región diana (ITS del rADN), a partir del lavado broncoalveolar de un paciente con infección probada.

La sonda diseñada para la detección de especies del género *Cryptococcus*, también dirigida a la región ITS1, permite la detección del complejo *Cryptococcus neoformans* (var *neoformans* y var *grubbi*), y, *Cryptococcus gattii*. Para simplificar la técnica, se diseñó una única sonda capaz de detectar cualquiera de estas especies puesto que el tratamiento de la infección es similar (La Hoz y Pappas, 2013). Con respecto a la detección de ADN de *Histoplasma capsulatum*, se empleó una sonda dirigida a la región ITS1 que se había utilizado en trabajos previos y que está registrada bajo el número de patente P 200802665.

Además de los controles habituales en cualquier técnica de PCR, se incluyó un control interno para descartar los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción. Dicho control consiste en la introducción, en el mismo tubo de PCR, de 1 fg de un plásmido que contiene un fragmento de una secuencia del genoma de una medusa (Limaye et al., 2001), para la cual se diseñaron cebadores y una sonda específica. Un retraso en el valor del ciclo de amplificación del control interno se corresponde con una inhibición en la amplificación. Además, la aparición de falsos positivos debidos a contaminaciones se reduce, en gran parte, con el uso de un sistema de tubo cerrado.

En el proceso de estandarización in vitro, la sensibilidad y la especificidad de la PCR fue del 100%, el coeficiente de variación en torno al 3% y la eficiencia del método de extracción de ADN de la muestra clínica superior al 80%. No se amplificó ADN de 21

cepas de especies de los géneros *Candida* (n=7), *Coccidioides* (n=1), *Paracoccidioides* (n=1), *Aspergillus* (n=4), *Fusarium* (n=3), *Scedosporium* (n=2) y Mucorales (n=3).

Asimismo, se realizó una validación clínica con 43 muestras de 40 pacientes con infección probada de acuerdo a los criterios EORTC/MSG (5 criptococosis, 14 histoplasmosis, 21 neumocistosis) (De Pauw et al., 2008). Debido a que en estos criterios no se incluye la neumonía por *P. jirovecii*, se consideró infección definitiva cuando los pacientes tenían sintomatología clínica de neumonía y se visualizaron al microscopio las formas tróficas. El ensayo se validó no sólo en muestras respiratorias (n=29) sino también en muestras de suero (n=2), sangre (n=3), biopsias (n=5) y aspirado de médula ósea (n=3) ya que son muestras útiles para detectar los episodios de infección sistémica (Huang y Crothers, 2009). En función del tipo de muestra, la PCR fue positiva en 29/29 muestras respiratorias, 1/3 aspirados de médula ósea, 3/3 muestras de sangre, 1/2 muestras de suero y 4/5 biopsias. Así, la PCR mostró una sensibilidad del 92,5% por pacientes y del 90,7% por muestra clínica. La PCR fue negativa en cuatro de las muestras clínicas (3 histoplasmosis y 1 criptococosis), pero dichas muestras se habían almacenado durante más de cinco años a -20°C lo que podría afectar a la calidad del ADN obtenido, como ya se ha descrito previamente (Lau et al., 2010). Por último, la técnica fue 100% específica y no se detectó ADN en 29 muestras clínicas de 29 pacientes incluidos en los siguientes grupos: (i) pacientes con VIH de área endémica sin neumonía (n=6); (ii) pacientes con VIH de área endémica con neumonía bacteriana o viral (n=4); y (iii) pacientes VIH (n=5) y no VIH (n=14) con otra infección fúngica invasora.

Una ventaja de este tipo de técnicas de detección múltiple es que permiten el diagnóstico de coinfecciones. A pesar de que el número de pacientes incluidos no fue muy elevado, se identificó un paciente diagnosticado de histoplasmosis que tenía una infección concomitante con *P. jirovecii*. Las coinfecciones en pacientes inmunodeprimidos son frecuentes y el diagnóstico exacto es determinante para poder establecer el tratamiento más adecuado (Javier et al., 2012; Pena et al., 2013). De hecho, en el 15% de los casos de histoplasmosis en VIH se ha descrito coinfección con tuberculosis (Gutiérrez et al., 2005). Asimismo, se han publicado varios casos de infecciones mixtas diagnosticados mediante métodos clásicos en los que

Discusión

H. capsulatum, *C. neoformans* y *P. jirovecii* estaban implicados (Baumann et al., 2013; Javier et al., 2012; Pena et al., 2013; Tschudy y Michail, 2010).

El sistema de detección múltiple desarrollado tiene, además, una gran flexibilidad, dependiendo por ejemplo del área geográfica donde se quiera aplicar. Así, mientras que en América Latina el sistema de triple detección sería útil (Colombo et al., 2011), en África se podría simplificar para sólo diagnosticar la criptococosis y la neumocistosis (Cogliati, 2013; Morrow et al., 2014). La incorporación de nuevos canales de detección y nuevos compuestos fluorescentes, que emitan a diferentes longitudes de onda permitiría la inclusión de nuevos patógenos en el ensayo como *Mycobacterium tuberculosis*, *Penicillium marneffeii*, etc.

El coste del ensayo es comparable o incluso más barato que los métodos tradicionales o de detección de biomarcadores empleados para el diagnóstico independiente de cada una de estas patologías (coste aproximado 100 € por determinación). Sin embargo, en países en desarrollo, este precio puede no ser competitivo. Por ello, para este tipo de países, puede ser necesario adaptar estas técnicas a sistemas de diagnóstico inmediato más sencillos y económicos. Esto incluiría mejoras en la extracción de ADN, que debe realizarse por un método simple y eficiente.

La comparación de esta PCR múltiple con los otros métodos de diagnóstico que se emplean actualmente no es posible, ya que no existe ninguno disponible que detecte los tres patógenos al mismo tiempo. Sin embargo, se pueden discutir los aspectos más importantes, tanto de las técnicas disponibles como las publicaciones recientes en diagnóstico para cada patógeno individualmente, ya que hay otros grupos de pacientes donde los sistemas de diagnóstico actuales no tienen buena sensibilidad y la PCR diagnóstica desarrollada en esta tesis puede ser útil.

En el diagnóstico de la neumocistosis, las técnicas de microscopía que se emplean rutinariamente tienen una sensibilidad cercana al 90% en lavado broncoalveolar de pacientes infectados por VIH (Fan et al., 2013). Sin embargo, cuando la carga fúngica es baja, la sensibilidad y el valor predictivo negativo de la prueba disminuyen hasta el 70% (Carmona y Limper, 2011; Wilson et al., 2011). Asimismo, la detección de 1,3-B-D

glucano tiene una sensibilidad del 93% en pacientes con VIH y síntomas respiratorios; sin embargo, el valor predictivo negativo de la técnica es del 60% y en pacientes con neumonía bacteriana o por otro hongo también ocasiona resultados positivos (Boyles, 2013; Esteves et al., 2014).

Respecto a las técnicas de PCR descritas, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los hongos, sólo hay una copia de la región ITS en el genoma de *P. jirovecii* (Nahimana et al., 2000); lo que es una ventaja para diferenciar entre población colonizada y población infectada (Alanio et al., 2011), ya que el número de copias que tienen los pacientes con infección es significativamente mayor que los que están colonizados (Matsumura et al., 2012). Otros genes monocopia como *cdc2* (Hauser et al., 2011), *DHPS*, (Munoz et al., 2012) y timidilato sintasa (Lu et al., 1995) se han empleado previamente con el mismo fin, aunque no se ha definido un valor umbral definitivo que discrimine colonización de infección (Arcenas et al., 2006). El establecimiento de un punto de corte entre colonización e infección sería de gran utilidad ya que se ha descrito colonización con *P. jiroveccii* en el 16% de los pacientes tratados con corticoides, en el 40% de los pacientes con EPOC, en el 6% de los pacientes con fibrosis quística y en el 46% de pacientes con infección por VIH asintomática (Morris y Norris, 2012). En concreto, el 60% de los pacientes tratados con corticoides, sometidos además a quimioterapia u otro fármaco inmunosupresor, desarrollan neumocistosis a pesar de un resultado negativo en microscopía (Ribes et al., 1997). Estos pacientes presentan síntomas atípicos, lo que conlleva un retraso en el establecimiento del tratamiento adecuado por lo que tiene una mortalidad asociada de entre el 35 y el 55% (Roblot et al., 2002; Roux et al., 2014). Por tanto, parece necesario estandarizar esta PCR con las diferentes poblaciones de riesgo de forma que se establezca un valor umbral que diferencie los pacientes realmente colonizados de los que van a desarrollar o ya tienen infección.

El potencial de las técnicas de PCR diagnóstica de neumocistosis como técnicas de referencia se ha evaluado en un meta-análisis reciente (Fan et al., 2013). Hasta el momento, la mayor parte de los sistemas descritos se basan en un sistema de amplificación mediante PCR anidada (Khodadadi et al., 2013; Maillet et al., 2014; Morrow et al., 2014). Aunque tienen una elevada sensibilidad (90%), la probabilidad de

Discusión

contaminación es de hasta el 19% (Wilson et al., 2011). La importancia de estas técnicas de PCR diagnóstica se ha visto reflejada en la comercialización de ensayos, el más extendido es el Myc(PCP)Assay que tiene una sensibilidad mayor del 90% en lavado broncoalveolar (Hauser et al., 2011; McTaggart et al., 2012; Orsi et al., 2012), aunque está pendiente su validación en pacientes colonizados.

Al igual que en el caso de la neumocistosis, los métodos disponibles para el diagnóstico de la meningitis criptocócica en pacientes con VIH tienen gran sensibilidad con los métodos disponibles y son muy económicos desde la comercialización de los dispositivos de diagnóstico inmediato (Boulware et al., 2014; Escandon et al., 2013; La Hoz y Pappas, 2013). De hecho, la sensibilidad del examen directo mediante tinta china de líquido cefalorraquídeo es superior al 80% y la detección del antígeno criptocócico en suero o líquido cefalorraquídeo es mayor del 99% (Binnicker et al., 2012). Sin embargo, en otro tipo de pacientes estas técnicas no son tan sensibles y los sistemas de detección de ADN pueden ser útiles. Este es el caso de los pacientes con criptococosis pulmonar y VIH donde la detección de antígeno en suero tiene una sensibilidad del 30% y es indicativa de infección diseminada (Liaw et al., 1995). Además, en estos pacientes la detección del antígeno capsular en lavado broncoalveolar y líquido pleural tiene una sensibilidad del 90%, pero un valor predictivo positivo del 63% (Kralovic y Rhodes, 1998). El diagnóstico de criptococosis en pacientes VIH con afección pulmonar es importante ya que los síntomas pueden preceder a la meningoencefalitis y el establecimiento de la terapia podría tener gran influencia en la supervivencia (Jarvis et al., 2010). En un estudio reciente (Lindsley et al., 2011), se ha evaluado la utilidad del dispositivo inmediato de diagnóstico de criptococosis en pacientes con neumonía y SIDA. Los resultados muestran que sólo el 13% tenían criptococosis lo que significa que el 87% tenían otro tipo de infección respiratoria. Es indudable que la aplicación de una tecnología de detección múltiple habría alcanzado un porcentaje mayor de diagnóstico etiológico en un solo paso, ya que muchos de estos pacientes podrían tener *P. jirovecii*. Además, la PCR diagnóstica podría ser útil para la monitorización de la respuesta al tratamiento o el establecimiento de profilaxis con fluconazol, donde la determinación antigénica es útil

en el líquido cefalorraquídeo pero no en el suero que es una muestra más fácil de obtener (Jarvis et al., 2013).

Finalmente, la PCR diagnóstica para la histoplasmosis reduce el riesgo asociado a la manipulación de este patógeno en el laboratorio y evita el retraso en obtener un diagnóstico definitivo debido al lento crecimiento de este hongo. Existen diversos ensayos de PCR diagnóstica para histoplasmosis obteniéndose la mejor sensibilidad con dianas en copia múltiple (86%) y ensayos de tiempo real (90%), siendo éstos últimos comparables a los de nuestro estudio (Buitrago et al., 2013b). El aumento en la sensibilidad que aporta la PCR diagnóstica permite también la detección temprana de la histoplasmosis cuando la serología es negativa (Wheat, 2009); y de los casos de histoplasmosis pulmonar aguda o subaguda donde la detección de antígeno en suero y orina tiene una sensibilidad del 30% (Wheat, 1995). Aunque el sistema de detección de antígenos desarrollado por Miravista (Indianapolis, Estados Unidos) tiene una buena sensibilidad y especificidad en paciente con VIH (92% y 100% respectivamente), este ensayo sólo se realiza en Estados Unidos, por lo que el envío de muestras supone un considerable retraso en el diagnóstico definitivo (Perfect, 2013; Wheat, 2009). Por ello, resulta de gran importancia el desarrollo de sistemas de diagnóstico que se puedan transferir entre laboratorios.

5.2. Diagnóstico de coccidioidomicosis en área endémica

La coccidioidomicosis, al igual que la histoplasmosis, es una micosis endémica causada por las especies *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii* que difieren en su distribución geográfica (Fisher et al., 2002). Así, mientras que *C. immitis* se limita al estado de California, *C. posadasii* tiene una distribución más amplia (Texas, Arizona, Méjico y Sudamérica) (Fisher et al., 2002; Hector et al., 2011). En los últimos años, se ha producido un aumento de estas micosis en zonas no endémicas que se ha asociado a viajes, inmigración o a largas estancias en estas regiones (Brugiere et al., 2009; Carvalho et al., 2010; Gobbi et al., 2012; Kantarcioglu et al., 2014; Kwok et al., 2009; Requena et al., 2012). Debido a que son patologías extremadamente raras en nuestro entorno, los laboratorios asistenciales tienen un déficit de capacitación diagnóstica y

Discusión

cuando ésta se sospecha hay que recurrir a los laboratorios de referencia, lo que con frecuencia conlleva un retraso en el diagnóstico. En los laboratorios de regiones endémicas el diagnóstico se suele hacer mediante el examen directo y el cultivo. La detección de anticuerpos (IgM e IgG) es útil y tiene una sensibilidad global del 82% con las técnicas disponibles (inmunodifusión, fijación del complemento y electroinmunoensayo) (Nguyen et al., 2013; Wheat, 2009). Sin embargo, en el paciente inmunodeprimido la sensibilidad de estas técnicas se reduce hasta el 53% (Ampel, 2010). Por tanto, el desarrollo de técnicas rápidas, como la PCR en tiempo real presentada en esta memoria son una ayuda inestimable en el diagnóstico de estas infecciones.

Esta PCR en tiempo real se basa en la amplificación y detección mediante una sonda *molecular beacon* de un fragmento de 187 pb en la región espaciadora interna del ADN ribosómico (rADN), ITS. Para simplificar la técnica, puesto que el tratamiento recomendado es el mismo para las dos especies ya que no se han descrito diferencias en la sensibilidad a los antifúngicos, se diseñó una única sonda. También se incluyó el control interno mencionado en la sección anterior, que permite descartar la existencia de falsos negativos debidos a inhibiciones de la PCR. El ensayo de PCR desarrollado tiene una especificidad y una sensibilidad *in vitro* del 100%, y una reproducibilidad analítica, $r^2 > 0.98$. La elevada sensibilidad de este ensayo es muy ventajosa, ya que se ha demostrado que la carga fúngica que circula en sangre o líquido cefalorraquídeo durante la infección es muy baja (Bicanic et al., 2007; Lengerova et al., 2012; Pfeiffer et al., 2011). Para los estudios de sensibilidad y especificidad *in vitro* se evaluaron 20 cepas clínicas de *Coccidioides* no relacionadas geográficamente, y 30 cepas de otras especies incluyendo hongos dimórficos como *H. capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Blastomyces dermatitidis*.

El ensayo también se validó en un modelo murino de coccidioidomicosis sistémica donde se comparó la estimación de la carga fúngica mediante PCR en tiempo real y la técnica convencional de recuento de colonias en placa. La realización de este modelo implica un procedimiento especialmente peligroso al ser *Coccidioides* spp. el hongo patógeno primario más virulento. De hecho, las artroconidias de *Coccidioides* son muy pequeñas, se desplazan largas distancias con facilidad y el inóculo necesario

para producir infección es inferior a 10 conidias (Clemons et al., 2007). El modelo se realizó en un laboratorio de nivel 3 de contención situado en San José, California, región endémica para este patógeno y donde existe una elevada incidencia de coccidioidomicosis. La concordancia entre ambas aproximaciones (PCR en tiempo real y recuento en placa) fue muy buena para los órganos evaluados (98% bazo, 100% hígado y pulmón). Sin embargo, los resultados mediante PCR a tiempo real muestran que la carga fúngica es entre 10-1000 veces mayor que cuando la determinación se realiza mediante cultivo microbiológico, lo que demuestra que la PCR es más sensible. Así, se pudo observar un aumento en la carga fúngica según progresaba la infección en bazo y pulmón, usando ambas técnicas, mientras que en el caso del hígado esta tendencia sólo se detectó mediante PCR cuantitativa. Aun así, la comparación de las pendientes de las rectas que reflejan la evolución de la infección no presentó diferencias significativas entre ambas técnicas para ninguno de los órganos analizados. El cultivo y la PCR de todas las muestras de hígado y pulmón fue positivo, sin embargo, en tres de las muestras de bazo, el cultivo fue negativo y el resultado de la PCR positivo. Estos resultados se consideraron verdaderos positivos, puesto que los animales tenían síntomas de infección y además los cultivos de los otros órganos analizados fueron positivos. La confirmación de estas discrepancias podría llevarse a cabo mediante el empleo de un mayor número de ratones aunque no estaría justificado debido a consideraciones éticas. Durante el tiempo de infección, también se evaluó la fungemia, sin embargo en todos los casos los resultados fueron negativos. En estudios previos se ha visto que los hemocultivos en la coccidioidomicosis son negativos en el 99,6% de los casos (Saubolle, 2007). Por último, la utilidad de esta técnica se demostró en cortes de tejido parafinado de ratón y conejo procedentes de un modelo de meningitis por *Coccidioides* (Capilla et al., 2007; Kamberi et al., 2007), y donde la sensibilidad fue superior a la descrita en tejido parafinado mediante otras técnicas de PCR cuantitativa (Binnicker et al., 2007).

Finalmente, el ensayo desarrollado se evaluó en 17 muestras clínicas de pacientes con infección probada (n=2), de pacientes que habían sido diagnosticados previamente de coccidioidomicosis y no tenían síntomas de infección (n=10) y de pacientes con otra infección fúngica (n=5). En el caso de los pacientes con

Discusión

coccidioidomicosis probada, la carga fúngica que se detectó fue de 96,25 equivalentes de conidia/gramo de tejido de pulmón y un promedio de 30 equivalentes de conidia/ml en el caso del suero y el coágulo sanguíneo. La técnica fue negativa en pacientes con otra infección fúngica y en aquellos previamente diagnosticados de coccidioidomicosis y bajo terapia antifúngica. De estos resultados se puede concluir que la técnica permitiría la detección de la infección y también tendría utilidad en el seguimiento de los pacientes una vez comenzado el tratamiento. Una excepción a estos buenos resultados fue un paciente diagnosticado con meningitis por *Coccidioides* que tuvo un resultado de PCR positivo a pesar de que se encontraba bajo terapia antifúngica. Sin embargo, la muestra de líquido cefalorraquídeo se tomó de un reservorio que se empleaba para la administración del antifúngico el cual pudiera estar contaminado con ADN de *Coccidioides*.

En los últimos años se han publicado varias aproximaciones para el diagnóstico de coccidioidomicosis mediante PCR en tiempo real basada en el uso de otro tipo de sondas (Taqman o FRET) que son sensibles (90-100%) en muestras respiratorias (Bialek et al., 2004; Binnicker et al., 2007; Wiwanitkit, 2010). Sin embargo, la sensibilidad en muestras de tejido parafinado es baja y el límite de detección es menor que en nuestro ensayo, lo que es importante para la detección temprana de la infección cuando la carga fúngica no es elevada (Bialek et al., 2004; Binnicker et al., 2007). Esta técnica de PCR en tiempo real puede ser especialmente útil en los casos de meningitis por *Coccidioides*, donde se necesita una gran cantidad de LCR para que la sensibilidad del cultivo sea aceptable (Saubolle, 2007), el crecimiento del patógeno es lento y la técnica de serodiagnóstico más empleada es la de fijación del complemento, que está circunscrita a laboratorios de referencia en Estados Unidos (Thompson et al., 2013).

La técnica de PCR desarrollada en este trabajo para el diagnóstico rápido de la coccidioidomicosis es reproducible y sensible. La introducción de la PCR en tiempo real en área no endémica es especialmente relevante ya que generalmente en estas regiones no hay sospecha clínica lo que retrasa el diagnóstico y, como consecuencia en el laboratorio de microbiología, frecuentemente se manipula el hongo antes de ser identificado lo cual es muy peligroso para el trabajador (Stevens et al., 2009). También es importante destacar que las especies del género *Coccidioides* spp. están incluidas en

varias listas de distintos organismos internacionales (OMS, convención de armas biológicas, CDC) como potenciales agentes bioterroristas por lo que el desarrollo de herramientas de detección y diagnóstico rápido de este microorganismo es necesario para dar respuesta a una posible situación de alerta (Buitrago Serna et al., 2007). Para finalizar, la incorporación de esta técnica a la cartera de servicios del Instituto de Salud Carlos III permitirá diagnosticar aquellas sospechas de coccidioidomicosis con un tiempo de respuesta de 24 horas tras la llegada de la muestra al servicio de micología del CNM y de este modo también se evitará la manipulación de los cultivos.

5.3. Identificación al nivel de especie y subespecie de levaduras patógenas mediante HRM

El sistema de referencia para la identificación de hongos patógenos se basa en la secuenciación de dianas informativas (Schoch et al., 2012). Sin embargo, esta aproximación es cara, necesita de una base de datos de secuencias fiable que no está siempre disponible. Una alternativa que se ha incorporado recientemente, es el análisis de perfiles proteicos mediante MALDI-TOF (Kolecka et al., 2013; Patel, 2013; Posteraro et al., 2013; Westblade et al., 2013) que aunque es un sistema muy utilizado en la identificación de bacterias, en el ámbito de la micología médica tiene ciertas limitaciones (Posteraro et al., 2013). Una de ellas es que la base de datos de espectros no es pública y no está bien validada con hongos, especialmente con los filamentosos, por lo que sólo identifica a un número relativamente pequeño de especies (L'Ollivier et al., 2013; Ranque et al., 2014).

Los equipos de PCR en tiempo real están disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos por lo que la disponibilidad de técnicas de identificación rápidas, sencillas y baratas en esta plataforma pueden ser útiles. Como ya se ha mencionado en la introducción, las técnicas basadas en el análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM) son de utilidad en el ámbito de la microbiología clínica aunque en micología están poco desarrolladas (Erali et al., 2008). Por este motivo, en este trabajo de tesis se ha empleado esta técnica para diseñar dos metodologías basadas en la identificación y el genotipado de especies fúngicas con importancia clínica.

5.3.1. HRM aplicado a la identificación de complejos de especies

El desarrollo de herramientas moleculares ha permitido la descripción de especies que antes eran indistinguibles mediante los métodos clásicos de observación macroscópica y microscópica de las estructuras morfológicas (Taylor et al., 2000). Como alternativa más simple a la secuenciación, se han desarrollado dos métodos basados en el análisis de las curvas de fusión de alta resolución para la identificación de especies del género *Cryptococcus* y del complejo *Candida parapsilosis*.

5.3.1.1. Identificación de los complejos de especies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*

El estudio de la diversidad genética de *Cryptococcus* proporciona información para comprender la distribución de las especies, la estructura de su población o cómo ha evolucionado para adquirir características patogénicas (Cogliati, 2013). Muchos de estos estudios utilizan técnicas complejas como el Luminex (Vanhee et al., 2010), los patrones de digestión enzimática de determinados genes (Sidrim et al., 2010), los análisis de secuencias multilocus (Meyer et al., 2009), los microsatélites (Hanafy et al., 2008) o el MALDI-TOF (Firacative et al., 2012; Posteraro et al., 2012). Estas técnicas tienen gran poder de discriminación y pueden llegar a distinguir hasta 9 genotipos distintos. Sin embargo, la interpretación de los resultados es compleja y requiere experiencia. Con el fin de caracterizar, de forma rápida y sencilla, las principales especies y variedades del género *Cryptococcus* que causan infección, se desarrolló un método de análisis de HRM. Para ello, se diseñó una PCR en tiempo real que permite la amplificación específica de un fragmento de 100 pb en la región ITS-1 de dichas especies. Se analizaron un total de 30 cepas distribuidas de la siguiente forma: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A, n=7), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D, n=5), *C. gattii* (serotipos B y C, n=8) e híbridos AD, BD y AB (n=10).

Debido a que en la región amplificada tan sólo existen tres polimorfismos, no se pudieron agrupar todos los genotipos con un análisis en un único paso. Por ello, se diseñó un método alternativo de análisis en dos pasos. En el primer paso se diferencia el complejo *C. neoformans* complex y *C. gattii* ya que tiene cambios en dos bases de la

secuencia amplificada y en el segundo *C. neoformans var. neoformans* de *C. neoformans var. grubii* que sólo tiene cambios en una base. En función de las propiedades termodinámicas del producto amplificado, las condiciones óptimas de análisis permiten observar uno de los cambios en la secuencia pero enmascaran los otros (Palais et al., 2005). Además, desde el punto de vista epidemiológico, la identificación correcta de *C. gattii* es importante ya que además de causar infección en individuos inmunocompetentes, su aislamiento en zonas no endémicas puede indicar circulación del patógeno (McMullan et al., 2013).

Aunque existen muchas formas de analizar variaciones de los nucleótidos de las regiones amplificadas, las técnicas disponibles requieren un paso adicional. Por lo general, este paso incluye el análisis de perfiles electroforéticos, la amplificación con un único oligonucleótido cebador, ligación y secuenciación que en general no suele estar disponible en los laboratorios asistenciales (Palais et al., 2005). El análisis de productos de PCR de pequeño tamaño mediante HRM es un método sencillo, en el cual se pueden ver variaciones en la secuencia de regiones conocidas (Erali et al., 2008). Se hace en un tubo cerrado, sin la necesidad de sondas ni procedimientos analíticos posteriores. Aunque este método no permite diferenciar los híbridos AD, se acorta considerablemente el tiempo de respuesta en comparación con los procedimientos que requieren secuenciación. Además, la técnica es barata ya que no se necesitan cebadores modificados y la molécula fluorescente empleada es genérica.

5.3.1.2. Identificación del complejo de especies *Candida parapsilosis*.

La identificación correcta de las especies del complejo *Candida parapsilosis* (*Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*) es necesaria debido a las diferencias en virulencia (Gago et al., 2014; Nemeth et al., 2013; Trevino-Rangel Rde et al., 2014) y sensibilidad a los antifúngicos (Moris et al., 2012; Spreghini et al., 2012; Szilagyi et al., 2012; Tosun et al., 2013). Estas especies son idénticas morfológicamente y bioquímicamente por lo que para su identificación hay que secuenciar dianas informativas. La región de referencia para la identificación de hongos patógenos es la región ITS del ADN ribosómico (Schoch et al., 2012). Sin embargo, los resultados de este estudio demuestran que en estas especies el poder

Discusión

resolutivo de esta diana no es bueno desde el punto de vista filogenético. En nuestro estudio se ha demostrado que la región IGS-1 del rADN, presente al igual que la ITS en copia múltiple, permite la identificación correcta y de forma robusta de las especies del complejo *C. parapsilosis*, siendo una diana más adecuada que la región ITS. El análisis de las secuencias de la región IGS-1 de este estudio demostró que las diferencias observadas entre las especies del complejo *C. parapsilosis* no se debían sólo a composición nucleotídica sino a variaciones en la longitud. Cabe destacar que aunque *C. orthopsilosis* se pudo definir en un único grupo filogenético, las cepas de esta especie tienen diferencias en su secuencia IGS-1. De hecho, aunque el número de cepas incluidas en este análisis es reducido, los resultados apoyan la hipótesis de la posible existencia de una cuarta especie críptica en el complejo *C. orthopsilosis*. Esta hipótesis ya ha sido evaluada en otros estudios mediante el análisis de regiones como el ADN mitocondrial (Valach et al., 2012) o las inteínas (Prandini et al., 2013). Sin embargo, para poder definir este cuarto grupo se necesita analizar un mayor número de genes y de cepas. En un estudio anterior se ha demostrado la utilidad de la región IGS-1 para identificar especies de este complejo mediante análisis de patrones electroforéticos tras digestión con enzimas de restricción (Cornet et al., 2011). Sin embargo, nunca se había secuenciado esta región en *C. parapsilosis* debido a la existencia de regiones homopoliméricas en el ADN cuya resolución con los métodos convencionales de secuenciación es compleja y necesita del diseño de cebadores internos y varias reacciones de secuenciación.

Debido a la complejidad que entraña la secuenciación de esta zona IGS-1 en este complejo de especies, una vez que se consiguió su secuenciación completa se diseñó una PCR en tiempo real con análisis de HRM para la diferenciación rápida y sencilla de las mismas. Se diseñó una pareja de cebadores comunes para las tres especies que permitió la amplificación de un fragmento de 70 pb de la región IGS-1. Se analizaron un total de 33 cepas, incluidas las cepas tipo ATCC, de especies del complejo *C. parapsilosis* (11 *C. parapsilosis*, 14 *C. orthopsilosis*, 8 *C. metapsilosis*), no relacionadas geográficamente y previamente identificadas mediante el análisis de las regiones ITS e IGS-1 del rADN. Tras el proceso de amplificación se realizó un ajuste manual de las condiciones de análisis. Los grupos se establecieron con un intervalo de

confianza del 98% y la concordancia entre la secuencia amplificada y los grupos constituidos fue del 100%. Puesto que la región IGS es una diana poco explorada, se realizó un ensayo de especificidad usando cepas de otros hongos y de *Lodderomyces elongiosporus*, especie muy cercana al complejo *-psilosis*. Ninguno de los hongos no relacionados fue amplificado en el sistema de PCR pero si *L. elongiosporus* que no se agrupó junto a ninguna de las especies del complejo (James et al., 1994). Esta especie se ha descrito como la causa de candidemia en una decena de pacientes en el mundo. A pesar de su baja incidencia, su identificación por métodos convencionales es difícil ya que es indistinguible morfológicamente y presenta el mismo perfil de asimilación de azúcares que *C. parapsilosis*, excepto en la coloración en agar cromogénico (Lockhart et al., 2008b).

Aunque se han publicado diferentes metodologías para la identificación de las especies crípticas del complejo *C. parapsilosis* muchas están basadas en la digestión de fragmentos de genes (RFLP, AFLP) y son poco reproducibles (Mirhendi et al., 2010; Tavanti et al., 2005; Tavanti et al., 2007; Van Asbeck et al., 2009). También se han desarrollado metodologías más complejas que implican la secuenciación de varios genes, como el MLST (Tavanti et al., 2005), o el uso de PCR en tiempo real mediante sondas, lo cual encarece el ensayo (García-Effron et al., 2011; Souza et al., 2012).

El método presentado en este trabajo es sencillo, rápido y puede ser transferido fácilmente a laboratorios asistenciales. La interpretación de los datos es simple, una vez establecidas las condiciones óptimas de análisis y los resultados se pueden obtener en menos de 24 horas.

5.3.2. HRM aplicado a la tipificación molecular: estudio de una infección recurrente

Tradicionalmente, se ha pensado que cada proceso infeccioso está producido por una única cepa. Sin embargo, estudios recientes basados en el análisis de la sensibilidad a los antimicrobianos, en métodos de secuenciación o de metagenómica, han permitido concluir que existe una gran diversidad microbiana durante los procesos de colonización o infección (Desnos-Ollivier et al., 2010). Las infecciones recurrentes o persistentes son frecuentes en individuos inmunodeprimidos con candidosis

Discusión

orofaríngea, candiduria, candidosis vulvovaginal o criptococosis tras el tratamiento prolongado con antifúngicos (Khatib et al., 1998; Lockhart et al., 1995). Los métodos más utilizados para establecer la relación entre aislados responsables de brotes o de procesos recurrentes son el análisis de secuencias de múltiples locus y el análisis de polimorfismos de regiones microsatélites (Vanhee et al., 2010). Ambas técnicas son complicadas técnicamente y requieren personal entrenado para su realización. Por ello, se necesita del desarrollo de herramientas fáciles de usar y transferibles.

Como método alternativo, se evaluó la utilidad del HRM para el análisis de la longitud de regiones microsatélites en tres genes de *Candida albicans*. Los tres marcadores moleculares, EF3, CDC3 e HIS3 han sido evaluados en estudios multicéntricos y se han definido como los más adecuados para la caracterización molecular de cepas de *C. albicans* mediante electroforesis capilar (García-Hermoso et al., 2010). En concreto, se analizaron, tanto por HRM como por electroforesis capilar, las regiones de microsatélites anteriormente descritas en 9 cepas de *C. albicans*. Las cepas se aislaron durante varios años en un caso de candiduria recurrente en un paciente con la enfermedad de Cachi-Riccii o ectasia tubular renal. Esta enfermedad congénita es una malformación de los túbulos colectores distales, cuya principal manifestación son las infecciones urinarias recurrentes y la litiasis renal (Gambaro et al., 2006).

En primer lugar, se analizó la longitud de las tres regiones amplificadas mediante la técnica de electroforesis capilar. Las cepas responsables de los episodios de candiduria formaron un único grupo, independiente de la población control y de su perfil de sensibilidad a los azoles. Posteriormente, la longitud de los fragmentos amplificados mediante PCR convencional se determinó mediante HRM obteniéndose los mismos resultados, aunque con menor poder de discriminación. Esto se debe a que cuando el número de genotipos que se van a analizar es mayor de siete, la definición de las curvas no es la adecuada y se pueden producir errores en los agrupamientos (Mader et al., 2008). Además, el análisis de regiones repetidas mediante HRM puede ser difícil, debido a que el cambio en el número de repeticiones podría no suponer cambios en el porcentaje del contenido de guaninas y citosinas en el producto amplificado, y con ello en la temperatura de fusión (Erali et al., 2008; Tong y Giffard,

2012). Por ello, los fragmentos homocigotos se agruparon juntos, independientemente de su tamaño, para los tres marcadores. El bajo poder de discriminación asociado a las técnicas de genotipado mediante HRM se ha descrito para el análisis de secuencias multilocus (Liew et al., 2004; Tong y Giffard, 2012). Sin embargo, estas técnicas tienen como ventaja respecto a las técnicas clásicas que permiten cribado rápido y sencillo de las cepas sin necesidad de un análisis posterior.

Las cepas aisladas en los distintos episodios de infección presentaron un patrón de sensibilidad diferente a los azoles. Durante los tres primeros años, las cepas aisladas fueron sensibles a fluconazol (CMI \leq 0,05 mg/l) pero posteriormente se fueron aislando cepas sensibles y resistentes al azar (CMI 0,25 - >64 mg/l). Se comprobó además que en 7 de las 9 cepas recuperadas existía una mezcla de poblaciones sensibles y resistentes al analizar la sensibilidad a fluconazol de colonias individuales en cada aislado. La coexistencia de poblaciones con diferente sensibilidad a los antifúngicos se ha relacionado en procesos de candidosis orofaríngea con fallo terapéutico y mala evolución de los pacientes (Da Matta et al., 2010; Khatib et al., 1998; Odds et al., 2006). Por ello, en episodios de recurrencia en los que se observa fallo terapéutico es importante realizar este tipo de ensayos y comprobar si existen poblaciones resistentes que se estén seleccionando durante el tratamiento antifúngico y sean la causa de los episodios de recurrencia.

De acuerdo con estos resultados, las infecciones recurrentes se pueden producir por una única cepa que, como consecuencia de la terapia prolongada con azoles, puede adquirir algún mecanismo de resistencia frente a los antifúngicos, y no por la reinfección con una nueva cepa. Caracterizar molecularmente de forma adecuada todas las cepas implicadas en episodios de recurrencia o en brotes hospitalarios es importante, ya que en ocasiones hay implicaciones legales y se requiere de un análisis preciso y urgente.

A pesar de que el HRM tiene menor poder de discriminación, presenta ventajas respecto a las técnicas clásicas. Así, se puede emplear en el laboratorio asistencial como primer abordaje del problema, ya que es fácil de interpretar, rápido (24 horas desde la recepción de la cepa) y tan sólo se requiere de un equipo de PCR en tiempo

real. Este análisis permitiría conocer en una primera aproximación si las cepas están relacionadas y posteriormente realizar un análisis más profundo si fuera necesario.

5.4. Aplicación de los Resultados: Perspectivas

Una de las principales líneas de investigación del Servicio de Micología del CNM es la mejora del diagnóstico e identificación de la infección fúngica invasora mediante el desarrollo de técnicas de diagnóstico rápido, como la PCR en tiempo real. Esta línea de trabajo ha permitido la inclusión de algunas de las técnicas desarrolladas en la cartera de servicios del laboratorio y su transferencia a laboratorios asistenciales de diferentes hospitales españoles. Además, algunas de estas aproximaciones se han patentado y/o intentado comercializar. Hasta la fecha, existe una patente aprobada para el diagnóstico simultáneo de histoplasmosis y paracoccidioidomicosis (P 200802665). La licencia de explotación de dicha patente la posee la empresa de base tecnológica del Instituto de Salud Carlos III MICOLOGÍA MOLECULAR S.L., surgida del Servicio de Micología.

Este trabajo de tesis es la continuación de esta trayectoria pero además, aporta algunas novedades importantes a las técnicas previamente desarrolladas. En primer lugar, se ha desarrollado la primera PCR múltiple para el diagnóstico diferencial de las especies que causan neumonía fúngica en paciente inmunocomprometido (*Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* y *Cryptococcus neoformans*). Los sistemas orientados al diagnóstico sindrómico son ventajosos ya que permiten la detección de especies que causan el mismo cuadro clínico pero que deben ser tratadas de diferente modo. Estos métodos son rápidos, sencillos y presentan elevada sensibilidad y especificidad. Además, la transferencia de esta tecnología a sistemas más económicos o de diagnóstico inmediato permitiría atender las necesidades concretas en los países en los que estas enfermedades tienen mayor prevalencia pero recursos limitados. Asimismo, permiten una reducción de los costes y la posibilidad de realizar un diagnóstico en los puntos de atención de regiones en desarrollo.

En segundo lugar, se ha desarrollado una técnica que permite la detección de especies del género *Coccidioides*, patógeno de nivel 3 y poco conocido fuera de las

regiones endémicas. Sin embargo, ya se han descrito los primeros casos de coccidioidomicosis importadas en Europa. El desarrollo de herramientas de diagnóstico rápido para las micosis endémicas es esencial ya que existe elevado riesgo de infección al manipular estos microorganismos y los métodos de diagnóstico disponibles tienen limitaciones como se han discutido anteriormente. La técnica desarrollada es sensible y específica y se ha validado en un modelo murino de infección pero requiere de una validación en muestras clínicas. Puesto que la validación clínica de estas técnicas requiere de un gran número de muestras y, para contar con la experiencia de micólogos de regiones endémicas, entre los años 2008 y 2009 se estableció una red de colaboración con países de dichas regiones (Red del programa de Ciencia y Tecnología para el desarrollo, Red MICOMOL-CYTED). De esta colaboración han surgido diversos trabajos y publicaciones, así como la solicitud de creación de una nueva Red para la validación y transferencia de estas tecnologías (Red CYTED, convocatoria 2014).

Por último, se ha empleado la PCR en Tiempo Real para el desarrollo de técnicas basadas en HRM, muy poco desarrolladas en el campo de la micología hasta la fecha. Los resultados obtenidos son muy prometedores ya que se trata de técnicas muy sencillas, fácilmente transferibles a los laboratorios asistenciales y que permiten tanto la identificación de especies crípticas, como el genotipado de aislados implicados en brotes hospitalarios o en infecciones recurrentes. Estas técnicas pueden ser una alternativa a las técnicas de secuenciación o a los sistemas basados en perfiles proteicos como el MALDI-TOF que no siempre están disponibles. Se abre así un campo con múltiples aplicaciones en la micología médica que hasta ahora apenas se había explorado.

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral y los desarrollos futuros que se generarán a partir de este trabajo, permitirán llegar al objetivo final de mejorar la calidad de la asistencia sanitaria en un campo muy complejo como es el diagnóstico de la infección fúngica invasora.

6. CONCLUSIONES

1. La PCR múltiple desarrollada en este trabajo permite detectar los patógenos que causan con mayor frecuencia neumonía fúngica, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Pneumocystis jirovecii*, con una sensibilidad del 90,2% y una especificidad del 100% en muestras de pacientes con infección probada. Los mejores resultados se obtuvieron en muestras respiratorias por la naturaleza de proceso que se diagnostica. La técnica permite además la detección de coinfecciones.
2. La PCR en tiempo real diseñada para el diagnóstico de la coccidioidomicosis tiene una sensibilidad superior al 90% y una especificidad del 100% en muestras clínicas de un modelo murino de infección sistémica y en pacientes con infección probada. La técnica permite evaluar la progresión de la infección, realizar el diagnóstico temprano y evita la manipulación de los cultivos. Se requiere un mayor número de muestras para realizar una validación de la técnica.
3. El análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM) permite la identificación específica y rápida de especies relacionadas del complejo *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* en base a un la secuencia de un fragmento de la región ITS del ADN ribosómico.
4. La región IGS-1 del ADN ribosómico es más adecuada que la región ITS para la identificación del complejo *Candida parapsilosis*: (*Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis* y *Candida parapsilosis*). La caracterización de la región IGS-1 ha permitido el desarrollo de una técnica basada en HRM que facilita la identificación rápida de las especies de dicho complejo.
5. El análisis de regiones de microsatélites mediante HRM es un método alternativo a la electroforesis capilar para el genotipado de *Candida albicans*. El estudio de un episodio de recurrencia mediante este método permitió obtener resultados similares a la electroforesis capilar aunque con menor poder de discriminación. Asimismo, se demostró la coexistencia de poblaciones sensibles y resistentes a fluconazol en un mismo aislado clínico del paciente.
6. Las técnicas de PCR en tiempo real para el diagnóstico e identificación de especies que causan infección fúngica invasora son rápidas, sencillas y

Conclusiones

específicas lo que permite su fácil transferencia a los laboratorios asistenciales del sistema nacional de Salud.

7. REFERENCIAS

- Aballea, S., Guelfucci, F., Wagner, J., Khemiri, A., Dietz, J. P., Sobel, J., Toumi, M.** 2013. Subjective health status and health-related quality of life among women with Recurrent Vulvovaginal Candidosis (RVVC) in Europe and the USA. *Health Qual Life Outcomes* **11**:169.
- Akpek, G., Lee, S. M., Gagnon, D. R., Cooley, T. P., Wright, D. G.** 2001. Bone marrow aspiration, biopsy, and culture in the evaluation of HIV-infected patients for invasive mycobacteria and histoplasma infections. *Am J Hematol* **67**:100-6.
- Alanio, A., Desoubeaux, G., Sarfati, C., Hamane, S., Bergeron, A., Azoulay, E., Molina, J. M., Derouin, F., Menotti, J.** 2011. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* **17**:1531-7.
- Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Monzón, A., Rodríguez-Tudela, J. L.** 2007. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:748-51.
- Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E., Peláez, T., Pemán, J., Zapico, S., Álvarez, M., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., Filpop Study.** 2013. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother* **57**:3380-7.
- Alcázar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L.** 2008. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1244-51.
- Alcoba-Florez, J., Méndez-Álvarez, S., Cano, J., Guarro, J., Pérez-Roth, E., Arévalo Mdel, P.** 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol* **43**:4107-11.
- Almyroudis, N. G., Segal, B. H.** 2009. Prevention and treatment of invasive fungal diseases in neutropenic patients. *Curr Opin Infect Dis* **22**:385-93.
- Ampel, N. M.** 2005. Coccidioidomycosis in persons infected with HIV type 1. *Clin Infect Dis* **41**:1174-8.
- Ampel, N. M.** 2007. Coccidioidomycosis in persons infected with HIV-1. *Ann N Y Acad Sci* **1111**:336-42.
- Ampel, N. M.** 2010. The diagnosis of coccidioidomycosis. *F1000 Med Rep* **2**. doi: 10.3410/M2-2. (*En prensa*).
- Antinori, S.** 2013. New Insights into HIV/AIDS-Associated *Cryptococcosis*. *ISRN AIDS* **2013**: e471363.
- Arancia, S., Sandini, S., De Bernardis, F., Fortini, D.** 2011. Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **69**:283-5.
- Arcenas, R. C., Uhl, J. R., Buckwalter, S. P., Limper, A. H., Crino, D., Roberts, G. D., Wengenack, N. L.** 2006. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* **54**:169-75.
- Arendrup, M. C.** 2013. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect*. doi: 10.1111/1469-0691.12513. (*En prensa*).

Referencias

- Arendrup, M. C., Bruun, B., Christensen, J. J., Fuursted, K., Johansen, H. K., Kjaeldgaard, P., Knudsen, J. D., Kristensen, L., Moller, J., Nielsen, L., Rosenvinge, F. S., Roder, B., Schonheyder, H. C., Thomsen, M. K., Truberg, K.** 2011. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol* **49**:325-34.
- Armstrong-James, D., Meintjes, G., Brown, G. D.** 2014. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol* **22**:120-127.
- Avni, T., Leibovici, L., Paul, M.** 2011. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* **49**:665-70.
- Barker, B. M., Jewell, K. A., Kroken, S., Orbach, M. J.** 2007. The population biology of *Coccidioides*: epidemiologic implications for disease outbreaks. *Ann N Y Acad Sci* **1111**:147-63.
- Barnes, R. A.** 2008. Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* **61 Suppl 1**:i3-6.
- Baumann, S., Reinwald, M., Haghi, D., Hofmann, W. K., Buchheidt, D.** 2013. Coinfection of *Pneumocystis jirovecii* and invasive pulmonary aspergillosis in an immunocompromised patient: a diagnostic challenge. *Onkologie* **36**:582-4.
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., Maier, W.** 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:99-108.
- Bennett, J. E., Kwon-Chung, K. J., Howard, D. H.** 1977. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* **105**:582-6.
- Bernal-Martínez, L., Buitrago, M. J., Castelli, M. V., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M.** 2013. Development of a single tube multiplex real-time PCR to detect the most clinically relevant *Mucormycetes* species. *Clin Microbiol Infect* **19**:E1-7.
- Bialek, R., Feucht, A., Aepinus, C., Just-Nubling, G., Robertson, V. J., Knobloch, J., Hohle, R.** 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* **40**:1644-7.
- Bialek, R., Fischer, J., Feucht, A., Najvar, L. K., Dietz, K., Knobloch, J., Graybill, J. R.** 2001. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* **39**:1506-9.
- Bialek, R., Kern, J., Herrmann, T., Tijerina, R., Cecenas, L., Reischl, U., González, G. M.** 2004. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. *J Clin Microbiol* **42**:778-83.
- Bicanic, T., Meintjes, G., Wood, R., Hayes, M., Rebe, K., Bekker, L. G., Harrison, T.** 2007. Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naive or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin B or fluconazole. *Clin Infect Dis* **45**:76-80.
- Binnicker, M. J., Buckwalter, S. P., Eisberner, J. J., Stewart, R. A., McCullough, A. E., Wohlfiel, S. L., Wengenack, N. L.** 2007. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **45**:173-8.
- Binnicker, M. J., Jespersen, D. J., Bestrom, J. E., Rollins, L. O.** 2012. Comparison of four assays for the detection of cryptococcal antigen. *Clin Vaccine Immunol* **19**:1988-90.

- Blair, J. E., Currier, J. T.** 2008. Significance of isolated positive IgM serologic results by enzyme immunoassay for coccidioidomycosis. *Mycopathologia* **166**:77-82.
- Blair, J. E., Mendoza, N., Force, S., Chang, Y. H., Gryb, T. E.** 2013. Clinical specificity of the enzyme immunoassay test for coccidioidomycosis varies according to the reason for its performance. *Clin Vaccine Immunol* **20**:95-8.
- Boondireke, S., Mungthin, M., Tan-ariya, P., Boonyongsunchai, P., Naaglor, T., Wattanatham, A., Treewatchareekorn, S., Leelayoova, S.** 2010. Evaluation of sensitivity of multiplex PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Pneumocystis jirovecii* in clinical samples. *J Clin Microbiol* **48**:3165-8.
- Botterel, F., Cabaret, O., Foulet, F., Cordonnier, C., Costa, J. M., Bretagne, S.** 2012. Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* **50**:227-31.
- Boulware, D. R., Rolfes, M. A., Rajasingham, R., von Hohenberg, M., Qin, Z., Taseera, K., Schutz, C., Kwizera, R., Butler, E. K., Meintjes, G., Muzoora, C., Bischof, J. C., Meya, D. B.** 2014. Multisite validation of cryptococcal antigen lateral flow assay and quantification by laser thermal contrast. *Emerg Infect Dis* **20**:45-53.
- Bouza, E., Muñoz, P.** 2008. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* **32 Suppl 2**:S87-91.
- Boyles, T. H.** 2013. Test performance of beta-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia put in a clinical context. *AIDS* **27**:1679.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., White, T. C.** 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* **4**:165rv13.
- Brown, G. D., Meintjes, G., Kolls, J. K., Gray, C., Horsnell, W., Working Group from the Embo-Aids Related Mycoses.** 2014. AIDS-related mycoses: the way forward. *Trends Microbiol* **22**:107-9.
- Brugiere, O., Forget, E., Biondi, G., Metivier, A. C., Mal, H., Dauriat, G., Faussart, A., Dupont, B., Lortholary, O., Dromer, F.** 2009. Coccidioidomycosis in a lung transplant recipient acquired from the donor graft in France. *Transplantation* **88**:1319-20.
- Buchheid, D., Hummel, M.** 2005. *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. *Med Mycol* **43 Suppl 1**:S139-45.
- Buitrago, M. J., Aguado, J. M., Ballén, A., Bernal-Martínez, L., Prieto, M., García-Reyne, A., García-Rodríguez, J., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M.** 2013a. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin Microbiol Infect* **19**:E271-7.
- Buitrago, M. J., Berenguer, J., Mellado, E., Rodríguez-Tudela, J., Cuenca-Estrella, M.** 2006. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**:665-8.
- Buitrago, M. J., Bernal-Martínez, L., Castelli, M. V., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M.** 2014. Analysis of Performance of Panfungal and Specific PCR-based Procedures for Etiological Diagnosis of Invasive Fungal Diseases on Tissue Biopsies with Proven Infection: a Seven Year Retrospective Analysis from a Reference Laboratory. *J Clin Microbiol*. doi: 10.1128/JCM.00328-14. (*En prensa*).
- Buitrago, M. J., Canteros, C. E., Frias De León, G., González, A., Marques-Evangelista De Oliveira, M., Muñoz, C. O., Ramírez, J. A., Toranzo, A. I., Zancope-Oliveira,**

Referencias

- R., Cuenca-Estrella, M.** 2013b. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev Iberoam Micol* **30**:256-60.
- Buitrago, M. J., Cuenca-Estrella, M.** 2012. [Current epidemiology and laboratory diagnosis of endemic mycoses in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **30**:407-13.
- Buitrago Serna, M. J., Casas Flecha, I., Eiros-Bouza, J. M., Escudero Nieto, R., Fedele, G., Jado García, I., Pozo Sánchez, F., Rubio Muñoz, J. M., Sánchez-Seco Farinas, M. P., Valdezate Ramos, S., Verdejo Ortés, J.** 2007. [Biodefense: a new challenge for microbiology and public health]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25**:190-8.
- Cano, M. V., Hajjeh, R. A.** 2001. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin Respir Infect* **16**:109-18.
- Capilla, J., Clemons, K. V., Sobel, R. A., Stevens, D. A.** 2007. Efficacy of amphotericin B lipid complex in a rabbit model of coccidioidal meningitis. *J Antimicrob Chemother* **60**:673-6.
- Carmona, E. M., Limper, A. H.** 2011. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. *Ther Adv Respir Dis* **5**:41-59.
- Carvalho, C., Ferreira, I., Gaiao, S., Guimaraes, S., Costa, R., Santos, J., Sampaio, S., Bustorff, M., Oliveira, G., Pestana, M.** 2010. Cerebral coccidioidomycosis after renal transplantation in a non-endemic area. *Transpl Infect Dis* **12**:151-4.
- Centers for Disease Control and Prevention.** 2013. Increase in reported coccidioidomycosis--United States, 1998-2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **62**:217-21.
- Clemons, K. V., Capilla, J., Stevens, D. A.** 2007. Experimental animal models of coccidioidomycosis. *Ann N Y Acad Sci* **1111**:208-24.
- Cogliati, M.** 2013. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica (Cairo)* **2013**: e675213.
- Colombo, A. L., Tobon, A., Restrepo, A., Queiroz-Telles, F., Nucci, M.** 2011. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* **49**:785-98.
- Connolly, P. A., Durkin, M. M., Lemonte, A. M., Hackett, E. J., Wheat, L. J.** 2007. Detection of *Histoplasma* antigen by a quantitative enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* **14**:1587-91.
- Cordonnier, C., Pautas, C., Maury, S., Vekhoff, A., Farhat, H., Suarez, F., Dhedin, N., Isnard, F., Ades, L., Kuhnowski, F., Foulet, F., Kuentz, M., Maison, P., Bretagne, S., Schwarzinger, M.** 2009. Empirical versus preemptive antifungal therapy for high-risk, febrile, neutropenic patients: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis* **48**:1042-51.
- Cornet, M., Sendid, B., Fradin, C., Gaillardin, C., Poulain, D., Nguyen, H. V.** 2011. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *J Mol Diagn* **13**:12-22.
- Correia, A., Sampaio, P., James, S., Pais, C.** 2006. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:313-7.

- Cuenca-Estrella, M., Bassetti, M., Lass-Flörl, C., Racil, Z., Richardson, M., Rogers, T. R. 2011. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother* **66 Suppl 1**:i15-24.
- Cuenca-Estrella, M., Bernal-Martínez, L., Buitrago, M. J., Castelli, M. V., Gómez-López, A., Zaragoza, O., Rodríguez-Tudela, J. L. 2008. Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents* **32 Suppl 2**:S143-7.
- Cuenca-Estrella, M., Meije, Y., Díaz-Pedroche, C., Gómez-López, A., Buitrago, M. J., Bernal-Martínez, L., Grande, C., Juan, R. S., Lizasoain, M., Rodríguez-Tudela, J. L., Aguado, J. M. 2009. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* **47**:379-84.
- Cuenca-Estrella, M., Verweij, P. E., Arendrup, M. C., Arikan-Akdagli, S., Bille, J., Donnelly, J. P., Jensen, H. E., Lass-Flörl, C., Richardson, M. D., Akova, M., Bassetti, M., Calandra, T., Castagnola, E., Cornely, O. A., Garbino, J., Groll, A. H., Herbrecht, R., Hope, W. W., Kullberg, B. J., Lortholary, O., Meersseman, W., Petrikos, G., Roilides, E., Viscoli, C., Ullmann, A. J., ESCMID Fungal Infection Study Group. 2012. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* **18 Suppl 7**:9-18.
- Cuévara, M. S., Alhambra, A., Chaves, F., Moragues, M. D., Pontón, J., del Palacio, A. 2008. Use of a serum (1-->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis and follow-up of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Infect Dis* **47**:1364-6.
- Cullen, K. A., Arguin, P. M., Center for Global Health and Centers for Disease Control Prevention. 2013. Malaria surveillance--United States, 2011. *MMWR Surveill Summ* **62**:1-17.
- Chaturvedi, V., Chaturvedi, S. 2011. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends Microbiol* **19**:564-71.
- Chin, T. D., Tosh, F. E., Weeks, R. J. 1970. Ecological and epidemiological studies of histoplasmosis in the United States of America. *Mycopathol Mycol Appl* **41**:35-44.
- Choe, P. G., Kang, Y. M., Kim, G., Park, W. B., Park, S. W., Kim, H. B., Oh, M. D., Kim, E. C., Kim, N. J. 2014. Diagnostic value of direct fluorescence antibody staining for detecting *Pneumocystis jirovecii* in expectorated sputum from patients with HIV infection. *Med Mycol* **52**:326-30.
- D'Enfert, C. 2009. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr Opin Microbiol* **12**:358-64.
- Da Matta, D. A., Melo, A. S., Guimaraes, T., Frade, J. P., Lott, T. J., Colombo, A. L. 2010. Multilocus sequence typing of sequential *Candida albicans* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *Med Mycol* **48**:757-62.
- Dalpke, A. H., Hofko, M., Zimmermann, S. 2013. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* on the fully automated BD MAX platform. *J Clin Microbiol* **51**:2337-43.
- Daniels, R., Ndiaye, D., Wall, M., McKinney, J., Sene, P. D., Sabeti, P. C., Volkman, S. K., Mboup, S., Wirth, D. F. 2012. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with

Referencias

- drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:2976-86.
- Dannaoui, E., Schwarz, P., Slany, M., Loeffler, J., Jorde, A. T., Cuenca-Estrella, M., Hauser, P. M., Shrief, R., Huerre, M., Freiburger, T., Gaustad, P., Rodríguez-Tudela, J. L., Bille, J., Denning, D. W., Bretagne, S., Lortholary, O.** 2010. Molecular detection and identification of zygomycetes species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis: a collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) evaluation. *J Clin Microbiol* **48**:2043-6.
- De Pauw, B., Walsh, T. J., Donnelly, J. P., Stevens, D. A., Edwards, J. E., Calandra, T., Pappas, P. G., Maertens, J., Lortholary, O., Kauffman, C. A., Denning, D. W., Patterson, T. F., Maschmeyer, G., Bille, J., Dismukes, W. E., Herbrecht, R., Hope, W. W., Kibbler, C. C., Kullberg, B. J., Marr, K. A., Muñoz, P., Odds, F. C., Perfect, J. R., Restrepo, A., Ruhnke, M., Segal, B. H., Sobel, J. D., Sorrell, T. C., Viscoli, C., Wingard, J. R., Zaoutis, T., Bennett, J. E., EORTC/MSG Group.** 2008. 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* **46**:1813-21.
- Del Palacio, A., Cuétara, M. S., Llenas-García, J., Álvarez, M. E., Chaves, F., Pulido, F., Catalán, M., Pontón, J., Del Bono, V., Viscoli, C.** 2010. Serum (1-3)- β -D-Glucan assay for the diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. *Clin Vaccine Immunol* **17**:202-3; author reply 203.
- Denis, B., Lortholary, O.** 2013. [Pulmonary fungal infection in patients with AIDS]. *Rev Mal Respir* **30**:682-95.
- Denning, D. W., Pleuvry, A., Cole, D. C.** 2013. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Med Mycol* **51**:361-70.
- Desnos-Ollivier, M., Patel, S., Spaulding, A. R., Charlier, C., García-Hermoso, D., Nielsen, K., Dromer, F.** 2010. Mixed infections and *In Vivo* evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *MBio* **1**. doi: 10.3410/f.4799956.4708054. (*En prensa*).
- Dhana, A.** 2013. Diagnosis of cryptococcosis and Prevention of cryptococcal Meningitis Using a Novel Point-of-Care Lateral Flow Assay. *Case Rep Med* **2013**: doi: 640216. (*En prensa*).
- Diekema, D., Arbefeville, S., Boyken, L., Kroeger, J., Pfaller, M.** 2012. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**:45-8.
- Dixit, A., Carroll, S. F., Qureshi, S. T.** 2009. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2009**: e840452.
- Douarre, P. E., Cashman, W., Buckley, J., Coffey, A., O'Mahony, J. M.** 2012. High resolution melting PCR to differentiate *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*"cattle type" and "sheep type". *J Microbiol Methods* **88**:172-4.
- Dworkin, M. S., Hanson, D. L., Kaplan, J. E., Jones, J. L., Ward, J. W.** 2000. Risk for preventable opportunistic infections in persons with AIDS after antiretroviral

- therapy increases CD4+ T lymphocyte counts above prophylaxis thresholds. *J Infect Dis* **182**:611-5.
- Erali, M., Voelkerding, K. V., Wittwer, C. T.** 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol* **85**:50-8.
- Escandón, P., Lizarazo, J., Agudelo, C. I., Chiller, T., Castaneda, E.** 2013. Evaluation of a rapid lateral flow immunoassay for the detection of cryptococcal antigen for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV patients in Colombia. *Med Mycol* **51**:765-8.
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., 3rd, Smith, T. F.** 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* **19**:165-256.
- Esteves, F., Lee, C. H., de Sousa, B., Badura, R., Seringa, M., Fernandes, C., Gaspar, J. F., Antunes, F., Matos, O.** 2014. (1-3)-Beta-D-glucan in association with lactate dehydrogenase as biomarkers of *Pneumocystis pneumonia* (PcP) in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. doi: 10.1007/s10096-014-2054-6. (*En prensa*).
- Fan, L. C., Lu, H. W., Cheng, K. B., Li, H. P., Xu, J. F.** 2013. Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review. *PLoS One* **8**:e73099.
- Firacative, C., Trilles, L., Meyer, W.** 2012. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *PLoS One* **7**:e37566.
- Fisher, M. C., Koenig, G. L., White, T. J., Taylor, J. W.** 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* **94**:73-84.
- Fisk, D. T., Meshnick, S., Kazanjian, P. H.** 2003. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* **36**:70-8.
- Florent, M., Katsahian, S., Vekhoff, A., Levy, V., Rio, B., Marie, J. P., Bouvet, A., Cornet, M.** 2006. Prospective evaluation of a polymerase chain reaction-ELISA targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* for the early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *J Infect Dis* **193**:741-7.
- Fraser, J. A., Giles, S. S., Wenink, E. C., Geunes-Boyer, S. G., Wright, J. R., Diezmann, S., Allen, A., Stajich, J. E., Dietrich, F. S., Perfect, J. R., Heitman, J.** 2005. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* **437**:1360-4.
- Gacser, A., Schafer, W., Nosanchuk, J. S., Salomon, S., Nosanchuk, J. D.** 2007. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* **44**:1336-41.
- Gago, S., García-Rodas, R., Cuesta, I., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A.** 2014. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence* **5**:278-85.
- Galgiani, J. N., Ampel, N. M.** 1990. *Coccidioides immitis* in patients with human immunodeficiency virus infections. *Semin Respir Infect* **5**:151-4.

Referencias

- Gambaro, G., Feltrin, G. P., Lupo, A., Bonfante, L., D'Angelo, A., Antonello, A.** 2006. Medullary sponge kidney (Lenarduzzi-Cacchi-Ricci disease): a Padua Medical School discovery in the 1930s. *Kidney Int* **69**:663-70.
- García-Effron, G., Cantón, E., Pemán, J., Dilger, A., Roma, E., Perlin, D. S.** 2011. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis* sensu lato species. *J Clin Microbiol* **49**:3257-61.
- García-Hermoso, D., MacCallum, D. M., Lott, T. J., Sampaio, P., Buitrago, M. J., Grenouillet, F., Klaassen, C. H., Bretagne, S.** 2010. Multicenter collaborative study for standardization of *Candida albicans* genotyping using a polymorphic microsatellite marker. *J Clin Microbiol* **48**:2578-81.
- García-Solache, M. A., Casadevall, A.** 2010. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *MBio* **1**. doi: 10.1128/mBio.00061-10. (*En prensa*).
- Garey, K. W., Rege, M., Pai, M. P., Mingo, D. E., Suda, K. J., Turpin, R. S., Bearden, D. T.** 2006. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis* **43**:25-31.
- Gobbi, F., Angheben, A., Farina, C., Buonfrate, D., Postiglione, C., Rossanese, A., Anselmi, M., Savio, C., Gobbo, M., Bisoffi, Z.** 2012. Coccidioidomycosis: first imported case in Italy. *J Travel Med* **19**:192-4.
- Gómez, B. L.** 2014. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: advances and challenges. *Rev Iberoam Micol* **31**:35-41.
- Guinea, J., Zaragoza, O., Escribano, P., Martín-Mazuelos, E., Pemán, J., Sánchez-Reus, F., Cuenca-Estrella, M., Candipop Project Group.** 2014. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:1529-37.
- Gutiérrez, M. E., Cantón, A., Sosa, N., Puga, E., Talavera, L.** 2005. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS in Panama: a review of 104 cases. *Clin Infect Dis* **40**:1199-202.
- Hage, C. A., Ribes, J. A., Wengenack, N. L., Baddour, L. M., Assi, M., McKinsey, D. S., Hammoud, K., Alapat, D., Babady, N. E., Parker, M., Fuller, D., Noor, A., Davis, T. E., Rodgers, M., Connolly, P. A., El Haddad, B., Wheat, L. J.** 2011. A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. *Clin Infect Dis* **53**:448-54.
- Halliday, C., Hoile, R., Sorrell, T., James, G., Yadav, S., Shaw, P., Bleakley, M., Bradstock, K., Chen, S.** 2006. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *Br J Haematol* **132**:478-86.
- Hamilton, A. J.** 1998. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. *Med Mycol* **36**:351-64.
- Hanafy, A., Kaocharoen, S., Jover-Botella, A., Katsu, M., Iida, S., Kogure, T., Gono, T., Mikami, Y., Meyer, W.** 2008. Multilocus microsatellite typing for *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *Med Mycol* **46**:685-96.
- Hanson, K. E., Pfeiffer, C. D., Lease, E. D., Balch, A. H., Zaas, A. K., Perfect, J. R., Alexander, B. D.** 2012. Beta-D-glucan surveillance with preemptive anidulafungin for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a randomized pilot study. *PLoS One* **7**:e42282.

- Hauser, P. M., Bille, J., Lass-Flörl, C., Geltner, C., Feldmesser, M., Levi, M., Patel, H., Muggia, V., Alexander, B., Hughes, M., Follett, S. A., Cui, X., Leung, F., Morgan, G., Moody, A., Perlin, D. S., Denning, D. W.** 2011. Multicenter, prospective clinical evaluation of respiratory samples from subjects at risk for *Pneumocystis jirovecii* infection by use of a commercial real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* **49**:1872-8.
- Havlickova, B., Czaika, V. A., Friedrich, M.** 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* **51 Suppl 4**:2-15.
- Hector, R. F., Rutherford, G. W., Tsang, C. A., Erhart, L. M., McCotter, O., Anderson, S. M., Komatsu, K., Tabnak, F., Vugia, D. J., Yang, Y., Galgiani, J. N.** 2011. The public health impact of coccidioidomycosis in Arizona and California. *Int J Environ Res Public Health* **8**:1150-73.
- Hooper, J. E., Lu, Q., Pepkowitz, S. H.** 2007. Disseminated coccidioidomycosis in pregnancy. *Arch Pathol Lab Med* **131**:652-5.
- Horn, D. L., Neofytos, D., Anaissie, E. J., Fishman, J. A., Steinbach, W. J., Olyaei, A. J., Marr, K. A., Pfaller, M. A., Chang, C. H., Webster, K. M.** 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* **48**:1695-703.
- Hrncirova, K., Lengerova, M., Kocmanova, I., Racil, Z., Volfova, P., Palousova, D., Moulis, M., Weinbergerova, B., Winterova, J., Toskova, M., Pospisilova, S., Mayer, J.** 2010. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* **48**:3392-4.
- Hsu, J. L., Ruoss, S. J., Bower, N. D., Lin, M., Holodniy, M., Stevens, D. A.** 2011. Diagnosing invasive fungal disease in critically ill patients. *Crit Rev Microbiol* **37**:277-312.
- Huang, L., Crothers, K.** 2009. HIV-associated opportunistic pneumonias. *Respirology* **14**:474-85.
- Hummel, M., Spiess, B., Kentouche, K., Niggemann, S., Böhm, C., Reuter, S., Kiehl, M., Morz, H., Hehlmann, R., Buchheidt, D.** 2006. Detection of *Aspergillus* DNA in cerebrospinal fluid from patients with cerebral aspergillosis by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* **44**:3989-93.
- James, S. A., Collins, M. D., Roberts, I. N.** 1994. The genetic relationship of *Lodderomyces elongisporus* to other ascomycete yeast species as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Lett Appl Microbiol* **19**:308-11.
- Jarvis, J. N., Harrison, T. S., Lawn, S. D., Meintjes, G., Wood, R., Cleary, S.** 2013. Cost effectiveness of cryptococcal antigen screening as a strategy to prevent HIV-associated cryptococcal meningitis in South Africa. *PLoS One* **8**:e69288.
- Jarvis, J. N., Percival, A., Bauman, S., Pelfrey, J., Meintjes, G., Williams, G. N., Longley, N., Harrison, T. S., Kozel, T. R.** 2011. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* **53**:1019-23.
- Jarvis, J. N., Wainwright, H., Harrison, T. S., Rebe, K., Meintjes, G.** 2010. Pulmonary cryptococcosis misdiagnosed as smear-negative pulmonary tuberculosis with fatal consequences. *Int J Infect Dis* **14 Suppl 3**:e310-2.

Referencias

- Javier, B., Susana, L., Santiago, G., Alcides, T. 2012. Pulmonary coinfection by *Pneumocystis jiroveci* and *Cryptococcus neoformans*. Asian Pac J Trop Biomed 2:80-2.
- Kamberi, P., Sobel, R. A., Clemons, K. V., Waldvogel, A., Striebel, J. M., Williams, P. L., Stevens, D. A. 2007. Comparison of itraconazole and fluconazole treatments in a murine model of coccidioidal meningitis. Antimicrob Agents Chemother 51:998-1003.
- Kantarcioglu, A. S., Sandoval-Denis, M., Aygun, G., Kiraz, N., Akman, C., Apaydin, H., Karaman, E., Guarro, J., de Hoog, G. S., Gurel, M. S. 2014. First imported coccidioidomycosis in Turkey: A potential health risk for laboratory workers outside endemic areas. Med Mycol Case Rep 3:20-5.
- Kaouech, E., Kallel, K., Anane, S., Belhadj, S., Abdellatif, S., Mnif, K., Ben Othmane, T., Ben Lakhal, S., Kilani, B., Ben Chaabane, T., Chaker, E. 2009. [*Pneumocystis jiroveci* pneumonia: Comparison between conventional PCR and staining techniques]. Pathol Biol (Paris) 57:373-7.
- Karageorgopoulos, D. E., Vouloumanou, E. K., Ntziora, F., Michalopoulos, A., Rafailidis, P. I., Falagas, M. E. 2011. Beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis 52:750-70.
- Kasuga, T., White, T. J., Koenig, G., McEwen, J., Restrepo, A., Castaneda, E., Da Silva Lacaz, C., Heins-Vaccari, E. M., De Freitas, R. S., Zancope-Oliveira, R. M., Qin, Z., Negroni, R., Carter, D. A., Mikami, Y., Tamura, M., Taylor, M. L., Miller, G. F., Poonwan, N., Taylor, J. W. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Mol Ecol 12:3383-401.
- Kauffman, C. A. 2007. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. Clin Microbiol Rev 20:115-32.
- Kawazu, M., Kanda, Y., Nannya, Y., Aoki, K., Kurokawa, M., Chiba, S., Motokura, T., Hirai, H., Ogawa, S. 2004. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1->3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. J Clin Microbiol 42:2733-41.
- Khatib, R., Ayeni, O., Riederer, K. M., Briski, L. E., Wilson, F. M. 1998. Strain relatedness in persistent and recurrent candiduria. J Urol 159:2054-6.
- Khlif, M., Mary, C., Sellami, H., Sellami, A., Dumon, H., Ayadi, A., Ranque, S. 2009. Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia. Clin Microbiol Infect 15:656-61.
- Khodadadi, H., Mirhendi, H., Mohebal, M., Kordbacheh, P., Zarrinfar, H., Makimura, K. 2013. *Pneumocystis jirovecii* Colonization in Non-HIV-Infected Patients Based on Nested-PCR Detection in Bronchoalveolar Lavage Samples. Iran J Public Health 42:298-305.
- Khot, P. D., Fredricks, D. N. 2009. PCR-based diagnosis of human fungal infections. Expert Rev Anti Infect Ther 7:1201-21.
- Kirby, A., Chapman, C., Hassan, C., Burnie, J. 2004. The diagnosis of hepatosplenic candidiasis by DNA analysis of tissue biopsy and serum. J Clin Pathol 57:764-5.
- Klont, R. R., Mennink-Kersten, M. A., Verweij, P. E. 2004. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. Clin Infect Dis 39:1467-74.

- Knutsen, A. P., Bush, R. K., Demain, J. G., Denning, D. W., Dixit, A., Fairs, A., Greenberger, P. A., Kariuki, B., Kita, H., Kurup, V. P., Moss, R. B., Niven, R. M., Pashley, C. H., Slavin, R. G., Vijay, H. M., Wardlaw, A. J. 2012. Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *J Allergy Clin Immunol* **129**:280-91; quiz 292-3.
- Kolecka, A., Khayhan, K., Groenewald, M., Theelen, B., Arabatzis, M., Velegraki, A., Kostrzewa, M., Mares, M., Taj-Aldeen, S. J., Boekhout, T. 2013. Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **51**:2491-500.
- Koo, S., Bryar, J. M., Page, J. H., Baden, L. R., Marty, F. M. 2009. Diagnostic performance of the (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis* **49**:1650-9.
- Kourkoumpetis, T. K., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Desalermos, A., Mylonakis, E. 2012. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* **54**:1322-31.
- Kralovic, S. M., Rhodes, J. C. 1998. Utility of routine testing of bronchoalveolar lavage fluid for cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol* **36**:3088-9.
- Kronstad, J. W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D'Souza, C. A., Griffiths, E. J., Geddes, J. M., Hu, G., Jung, W. H., Kretschmer, M., Saikia, S., Wang, J. 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* **9**:193-203.
- Kuberski, T., Herrig, J., Pappagianis, D. 2010. False-positive IgM serology in coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* **48**:2047-9.
- Kwok, H. K., Chan, J. W., Li, I. W., Chu, S. Y., Lam, C. W. 2009. Coccidioidomycosis as a rare cause of pneumonia in non-endemic areas: a short exposure history should not be ignored. *Respirology* **14**:617-20.
- L'Ollivier, C., Cassagne, C., Normand, A. C., Bouchara, J. P., Contet-Audonneau, N., Hendrickx, M., Fourquet, P., Coulibaly, O., Piarroux, R., Ranque, S. 2013. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Med Mycol* **51**:713-20.
- La Hoz, R. M., Pappas, P. G. 2013. Cryptococcal infections: changing epidemiology and implications for therapy. *Drugs* **73**:495-504.
- Lalitha, P., Sun, C. Q., Prajna, N. V., Karpagam, R., Geetha, M., O'Brien, K. S., Cevallos, V., McLeod, S. D., Acharya, N. R., Lietman, T. M., Mycotic Ulcer Treatment Trial Group. 2014. In vitro susceptibility of filamentous fungal isolates from a corneal ulcer clinical trial. *Am J Ophthalmol* **157**:318-26.
- Landlinger, C., Preuner, S., Baskova, L., van Grotel, M., Hartwig, N. G., Dworzak, M., Mann, G., Attarbaschi, A., Kager, L., Peters, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Lion, T. 2010. Diagnosis of invasive fungal infections by a real-time panfungal PCR assay in immunocompromised pediatric patients. *Leukemia* **24**:2032-8.
- Laniado-Laborin, R. 2007. Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the Western hemisphere. *Ann N Y Acad Sci* **1111**:19-34.
- Lass-Flörl, C., Gunsilius, E., Gastl, G., Bonatti, H., Freund, M. C., Gschwendtner, A., Kropshofer, G., Dierich, M. P., Petzer, A. 2004. Diagnosing invasive aspergillosis

Referencias

- during antifungal therapy by PCR analysis of blood samples. *J Clin Microbiol* **42**:4154-7.
- Lau, A., Halliday, C., Chen, S. C., Playford, E. G., Stanley, K., Sorrell, T. C.** 2010. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J Clin Microbiol* **48**:811-6.
- Lengerova, M., Kocmanova, I., Racil, Z., Hrcirova, K., Pospisilova, S., Mayer, J., Najvar, L. K., Wiederhold, N. P., Kirkpatrick, W. R., Patterson, T. F.** 2012. Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)-beta-D-glucan detection. *J Clin Microbiol* **50**:602-8.
- Levesque, S., Michaud, S., Arbeit, R. D., Frost, E. H.** 2011. High-resolution melting system to perform multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* **6**:e16167.
- Li, S. S., Mody, C. H.** 2010. *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc* **7**:186-96.
- Liaw, Y. S., Yang, P. C., Yu, C. J., Chang, D. B., Wang, H. J., Lee, L. N., Kuo, S. H., Luh, K. T.** 1995. Direct determination of cryptococcal antigen in transthoracic needle aspirate for diagnosis of pulmonary cryptococcosis. *J Clin Microbiol* **33**:1588-91.
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., Wittwer, C.** 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem* **50**:1156-64.
- Limaye, A. P., Huang, M. L., Leisenring, W., Stensland, L., Corey, L., Boeckh, M.** 2001. Cytomegalovirus (CMV) DNA load in plasma for the diagnosis of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *J Infect Dis* **183**:377-82.
- Lindsley, M. D., Mekha, N., Baggett, H. C., Surinthong, Y., Autthateinchai, R., Sawatwong, P., Harris, J. R., Park, B. J., Chiller, T., Balajee, S. A., Poonwan, N.** 2011. Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of cryptococcosis. *Clin Infect Dis* **53**:321-5.
- Lockhart, S. R., Fritch, J. J., Meier, A. S., Schroppel, K., Srikantha, T., Galask, R., Soll, D. R.** 1995. Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol* **33**:1501-9.
- Lockhart, S. R., Messer, S. A., Pfaller, M. A., Diekema, D. J.** 2008a. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* **46**:2659-64.
- Lockhart, S. R., Messer, S. A., Pfaller, M. A., Diekema, D. J.** 2008b. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J Clin Microbiol* **46**:374-6.
- Lu, J. J., Chen, C. H., Bartlett, M. S., Smith, J. W., Lee, C. H.** 1995. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* **33**:2785-8.
- Mader, E., Lukas, B., Novak, J.** 2008. A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BMC Genet* **9**:e69.
- Maertens, J., Buve, K., Theunissen, K., Meersseman, W., Verbeken, E., Verhoef, G., Van Eldere, J., Lagrou, K.** 2009. Galactomannan serves as a surrogate endpoint

- for outcome of pulmonary invasive aspergillosis in neutropenic hematology patients. *Cancer* **115**:355-62.
- Maertens, J., Theunissen, K., Verhoef, G., Verschakelen, J., Lagrou, K., Verbeken, E., Wilmer, A., Verhaegen, J., Boogaerts, M., Van Eldere, J.** 2005. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* **41**:1242-50.
- Maillet, M., Maubon, D., Brion, J. P., Francois, P., Molina, L., Stahl, J. P., Epaulard, O., Bosseray, A., Pavese, P.** 2014. *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**:331-6.
- Malani, A., Hmoud, J., Chiu, L., Carver, P. L., Bielaczyc, A., Kauffman, C. A.** 2005. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin Infect Dis* **41**:975-81.
- Martagon-Villamil, J., Shrestha, N., Sholtis, M., Isada, C. M., Hall, G. S., Bryne, T., Lodge, B. A., Reller, L. B., Procop, G. W.** 2003. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **41**:1295-8.
- Martínez, A., Halliez, M. C., Aliouat el, M., Chabe, M., Standaert-Vitse, A., Frealle, E., Gantois, N., Pottier, M., Pinon, A., Dei-Cas, E., Aliouat-Denis, C. M.** 2013. Growth and airborne transmission of cell-sorted life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *PLoS One* **8**:e79958.
- Matsumura, Y., Ito, Y., Iinuma, Y., Yasuma, K., Yamamoto, M., Matsushima, A., Nagao, M., Takakura, S., Ichiyama, S.** 2012. Quantitative real-time PCR and the (1-->3)-beta-D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Clin Microbiol Infect* **18**:591-7.
- McMullan, B. J., Sorrell, T. C., Chen, S. C.** 2013. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. *Future Microbiol* **8**:1613-31.
- McMullan, R., Metwally, L., Coyle, P. V., Hedderwick, S., McCloskey, B., O'Neill, H. J., Patterson, C. C., Thompson, G., Webb, C. H., Hay, R. J.** 2008. 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* **46**:890-6.
- McTaggart, L. R., Wengenack, N. L., Richardson, S. E.** 2012. Validation of the MycAssay *Pneumocystis* kit for detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage specimens by comparison to a laboratory standard of direct immunofluorescence microscopy, real-time PCR, or conventional PCR. *J Clin Microbiol* **50**:1856-9.
- Mekha, N., Sugita, T., Makimura, K., Poonwan, N., Sawanpanyalert, P., Ikeda, R., Nishikawa, A.** 2010. The intergenic spacer region of the ribosomal RNA gene of *Penicillium marneffeii* shows almost no DNA sequence diversity. *Microbiol Immunol* **54**:714-6.
- Mengoli, C., Cruciani, M., Barnes, R. A., Loeffler, J., Donnelly, J. P.** 2009. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **9**:89-96.
- Mennink-Kersten, M. A., Donnelly, J. P., Verweij, P. E.** 2004a. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* **4**:349-57.

Referencias

- Mennink-Kersten, M. A., Klont, R. R., Warris, A., Op den Camp, H. J., Verweij, P. E.** 2004b. *Bifidobacterium lipoteichoic* acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. *Lancet* **363**:325-7.
- Meyer, W., Aanensen, D. M., Boekhout, T., Cogliati, M., Diaz, M. R., Esposto, M. C., Fisher, M., Gilgado, F., Hagen, F., Kaocharoen, S., Litvintseva, A. P., Mitchell, T. G., Simwami, S. P., Trilles, L., Viviani, M. A., Kwon-Chung, J.** 2009. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* **47**:561-70.
- Miceli, M. H., Graziutti, M. L., Woods, G., Zhao, W., Kocoglu, M. H., Barlogie, B., Anaissie, E.** 2008. Strong correlation between serum aspergillus galactomannan index and outcome of aspergillosis in patients with hematological cancer: clinical and research implications. *Clin Infect Dis* **46**:1412-22.
- Mikulska, M., Calandra, T., Sanguinetti, M., Poulain, D., Viscoli, C., Third European Conference on Infections in Leukemia Group.** 2010. 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* **14**:R222.
- Mirhendi, H., Bruun, B., Schonheyder, H. C., Christensen, J. J., Fursted, K., Gahrn-Hansen, B., Johansen, H. K., Nielsen, L., Knudsen, J. D., Arendrup, M. C.** 2010. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol* **59**:414-20.
- Moris, D. V., Melhem, M. S., Martins, M. A., Souza, L. R., Kacew, S., Szeszs, M. W., Carvalho, L. R., Pimenta-Rodrigues, M. V., Berghs, H. A., Mendes, R. P.** 2012. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* complex isolates collected from oral cavities of HIV-infected individuals. *J Med Microbiol* **61**:1758-65.
- Morrell, M., Fraser, V. J., Kollef, M. H.** 2005. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3640-5.
- Morris, A., Norris, K. A.** 2012. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* **25**:297-317.
- Morrow, B. M., Samuel, C. M., Zampoli, M., Whitelaw, A., Zar, H. J.** 2014. *Pneumocystis* pneumonia in South African children diagnosed by molecular methods. *BMC Res Notes* **7**: e26.
- Muhlethaler, K., Bogli-Stuber, K., Wasmer, S., von Garnier, C., Dumont, P., Rauch, A., Muhlemann, K., Garzoni, C.** 2012. Quantitative PCR to diagnose *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised non-HIV patients. *Eur Respir J* **39**:971-8.
- Muñoz, C., Zuluaga, A., Restrepo, A., Tobon, A., Cano, L. E., González, A.** 2012. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* **72**:204-13.
- Nahimana, A., Francioli, P., Blanc, D. S., Bille, J., Wakefield, A. E., Hauser, P. M.** 2000. Determination of the copy number of the nuclear rDNA and beta-tubulin genes of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* using PCR multicompetitors. *J Eukaryot Microbiol* **47**:368-72.

- Nemeth, T., Toth, A., Szenzenstein, J., Horvath, P., Nosanchuk, J. D., Grozer, Z., Toth, R., Papp, C., Hamari, Z., Vagvolgyi, C., Gacser, A.** 2013. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species. *PLoS One* **8**:e68704.
- Nguyen, C., Barker, B. M., Hoover, S., Nix, D. E., Ampel, N. M., Frelinger, J. A., Orbach, M. J., Galgiani, J. N.** 2013. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of coccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* **26**:505-25.
- Nguyen, M. H., Wissel, M. C., Shields, R. K., Salomoni, M. A., Hao, B., Press, E. G., Shields, R. M., Cheng, S., Mitsani, D., Vadnerkar, A., Silveira, F. P., Kleiboeker, S. B., Clancy, C. J.** 2012. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* **54**:1240-8.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K. H., Koljalg, U.** 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One* **1**:e59.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I. N., Cortes, J., Zurita, J., Guzmán-Blanco, M., Santolaya, M. E., Thompson, L., Sifuentes-Osornio, J., Echevarria, J. I., Colombo, A. L., Latin American Invasive Mycosis Network.** 2013. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One* **8**:e59373.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobon, A. M., Restrepo, A., Colombo, A. L.** 2010. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* **51**:561-70.
- Obayashi, T., Negishi, K., Suzuki, T., Funata, N.** 2008. Reappraisal of the serum (1->3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis* **46**:1864-70.
- Odds, F. C., Davidson, A. D., Jacobsen, M. D., Tavanti, A., Whyte, J. A., Kibbler, C. C., Ellis, D. H., Maiden, M. C., Shaw, D. J., Gow, N. A.** 2006. *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **44**:3647-58.
- Odell, I. D., Cloud, J. L., Seipp, M., Wittwer, C. T.** 2005. Rapid species identification within the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group by high-resolution melting analysis of hsp65 PCR products. *Am J Clin Pathol* **123**:96-101.
- Onishi, A., Sugiyama, D., Kogata, Y., Saegusa, J., Sugimoto, T., Kawano, S., Morinobu, A., Nishimura, K., Kumagai, S.** 2012. Diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* **50**:7-15.
- Orsi, C. F., Colombari, B., Blasi, E.** 2010. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the '*C. parapsilosis*' complex. *Med Mycol* **48**:1024-33.
- Orsi, C. F., Gennari, W., Venturelli, C., La Regina, A., Pecorari, M., Righi, E., Machetti, M., Blasi, E.** 2012. Performance of 2 commercial real-time polymerase chain reaction assays for the detection of *Aspergillus* and *Pneumocystis* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from critical care patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**:138-43.
- Ostrosky-Zeichner, L.** 2012. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med* **125**:S14-24.

Referencias

- Ozbak, H., Dark, P., Maddi, S., Chadwick, P., Warhurst, G. 2012. Combined molecular gram typing and high-resolution melting analysis for rapid identification of a syndromic panel of bacteria responsible for sepsis-associated bloodstream infection. *J Mol Diagn* **14**:176-84.
- Palais, R. A., Liew, M. A., Wittwer, C. T. 2005. Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping. *Anal Biochem* **346**:167-75.
- Patel, R. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis* **57**:564-72.
- Pemán, J., Cantón, E., Quindós, G., Eraso, E., Alcoba, J., Guinea, J., Merino, P., Ruíz-Pérez-de-Pipaon, M. T., Pérez-del-Molino, L., Linares-Sicilia, M. J., Marco, F., García, J., Rosello, E. M., Gómez, G., Borrell, N., Porrás, A., Yagüe, G., **Fungemyca Study Group**. 2012. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* **67**:1181-7.
- Pemán, J., Zaragoza, R. 2012. [Towards an early diagnosis of invasive candidiasis in the critically ill patient]. *Rev Iberoam Micol* **29**:71-5.
- Pena, Z. G., Byers, H. R., Lehmer, L. M., Smith, C. A., Ragsdale, B. D. 2013. Mixed *Pneumocystis* and *Cryptococcus* cutaneous infection histologically mimicking xanthoma. *Am J Dermatopathol* **35**:e6-10.
- Perfect, J. R. 2013. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr Med Res Opin* **29 Suppl 4**:3-11.
- Pfaller, M., Neofytos, D., Diekema, D., Azie, N., Meier-Kriesche, H. U., Quan, S. P., Horn, D. 2012. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* **74**:323-31.
- Pfaller, M. A. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* **125**:S3-13.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**:133-63.
- Pfeiffer, C. D., Fine, J. P., Safdar, N. 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* **42**:1417-27.
- Pfeiffer, C. D., Samsa, G. P., Schell, W. A., Reller, L. B., Perfect, J. R., Alexander, B. D. 2011. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *J Clin Microbiol* **49**:2879-83.
- Pitz Ade, F., Koishi, A. C., Tavares, E. R., Andrade, F. G., Loth, E. A., Gandra, R. F., Venancio, E. J. 2013. An optimized one-tube, semi-nested PCR assay for *Paracoccidioides brasiliensis* detection. *Rev Soc Bras Med Trop* **46**:783-5.
- Poikonen, E., Lyytikäinen, O., Anttila, V. J., Koivula, I., Lumio, J., Kotilainen, P., Syrjala, H., Ruutu, P. 2010. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. *BMC Infect Dis* **10**:e312.
- Poikonen, E., Lyytikäinen, O., Anttila, V. J., Ruutu, P. 2003. Candidemia in Finland, 1995-1999. *Emerg Infect Dis* **9**:985-90.
- Pontón, J. 2009. [Usefulness of biological markers in the diagnosis of invasive candidiasis]. *Rev Iberoam Micol* **26**:8-14.
- Posteraro, B., De Carolis, E., Vella, A., Sanguinetti, M. 2013. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics* **10**:151-64.

- Posteraro, B., Vella, A., Cogliati, M., De Carolis, E., Florio, A. R., Posteraro, P., Sanguinetti, M., Tortorano, A. M. 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. J Clin Microbiol **50**:2472-6.
- Prandini, T. H., Theodoro, R. C., Bruder-Nascimento, A. C., Scheel, C. M., Bagagli, E. 2013. Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification. J Clin Microbiol **51**:2830-6.
- Procop, G. W., Haddad, S., Quinn, J., Wilson, M. L., Henshaw, N. G., Reller, L. B., Artymyshyn, R. L., Katanik, M. T., Weinstein, M. P. 2004. Detection of *Pneumocystis jiroveci* in respiratory specimens by four staining methods. J Clin Microbiol **42**:3333-5.
- Procop, G. W., Roberts, G. D. 2004. Emerging fungal diseases: the importance of the host. Clin Lab Med **24**:691-719, vi-vii.
- Puig-Asensio, M., Padilla, B., Garnacho-Montero, J., Zaragoza, O., Aguado, J. M., Zaragoza, R., Montejo, M., Muñoz, P., Ruíz-Camps, I., Cuenca-Estrella, M., Almirante, B., Candipop Project Group. 2013. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. Clin Microbiol Infect. doi: 10.1111/1469-0691.12380. (En prensa).
- Qazzafi, Z., Thiruchunapalli, D., Birkenhead, D., Bell, D., Sandoe, J. A. 2007. Invasive *Cryptococcus neoformans* infection in an asplenic patient. J Infect **55**:566-8.
- Qishui, O., Ling, J., Ni, L., Bin, Y., Wen, L. 2012. Comparison of real-time fluorescence quantitative PCR measurements of VAD1 mRNA with three conventional methods in diagnosis and follow-up treatment of *Cryptococcus neoformans* infection. Mycoses **55**:326-32.
- Queiroz-Telles, F., Nucci, M., Colombo, A. L., Tobon, A., Restrepo, A. 2011. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. Med Mycol **49**:225-36.
- Ramírez Aguilar, M. L., Pérez Miravete, A., Santos Preciado, J. I. 1992. [Biological features and experimental pathogenicity of *Candida* strains isolated by hemoculture at the Hospital Infantil de Mexico "Federico Gómez"]. Rev Latinoam Microbiol **34**:259-65.
- Ranque, S., Normand, A. C., Cassagne, C., Murat, J. B., Bourgeois, N., Dalle, F., Gari-Toussaint, M., Fourquet, P., Hendrickx, M., Piarroux, R. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. Mycoses **57**:135-40.
- Reinwald, M., Spiess, B., Heinz, W. J., Vehreschild, J. J., Lass-Flörl, C., Kiehl, M., Schultheis, B., Krause, S. W., Wolf, H. H., Bertz, H., Maschmeyer, G., Hofmann, W. K., Buchheidt, D. 2012. Diagnosing pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies: a multicenter prospective evaluation of an *Aspergillus* PCR assay and a galactomannan ELISA in bronchoalveolar lavage samples. Eur J Haematol **89**:120-7.
- Requena, M. I., Moreno-García, M., Martínez-Rubio, C., Hens-Pérez, A., Ortiz-López, A., Vázquez-Rodríguez, M. C., Infección diseminada por *Coccidioides immitis*: A propósito de un caso. XXVI Congreso Nacional SEAP-IAP, Vol. P-382, Almería, España, 2012.

Referencias

- Ribes, J. A., Limper, A. H., Espy, M. J., Smith, T. F. 1997. PCR detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* **35**:830-5.
- Richardson, M., Lass-Flörl, C. 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 4**:5-24.
- Roblot, F., Godet, C., Le Moal, G., Garo, B., Faouzi Souala, M., Dary, M., De Gentile, L., Gandji, J. A., Guimard, Y., Lacroix, C., Roblot, P., Becq-Giraudon, B. 2002. Analysis of underlying diseases and prognosis factors associated with *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised HIV-negative patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**:523-31.
- Rodríguez-Cerdeira, C., Arenas, R., Moreno-Coutino, G., Vasquez, E., Fernández, R., Chang, P. 2014. Systemic fungal infections in patients with human immunodeficiency virus. *Actas Dermosifiliogr* **105**:5-17.
- Rodríguez-Tudela, J. L., Cuesta, I., Gómez-López, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martínez, L., Cuenca-Estrella, M. 2008. [Molecular techniques in mycology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26 Suppl 13**:47-53.
- Roux, A., González, F., Roux, M., Mehrad, M., Menotti, J., Zahar, J. R., Tadros, V. X., Azoulay, E., Brillet, P. Y., Vincent, F. 2014. Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. *Med Mal Infect.* doi: 10.1016/j.medmal.2014.01.007. (En prensa).
- Sandven, P., Bevanger, L., Digranes, A., Haukland, H. H., Mannsaker, T., Gaustad, P., Norwegian Yeast Study Group. 2006. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J Clin Microbiol* **44**:1977-81.
- Saubolle, M. A. 2007. Laboratory aspects in the diagnosis of coccidioidomycosis. *Ann N Y Acad Sci* **1111**:301-14.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:6241-6.
- Schoffelen, A. F., van Lelyveld, S. F., Barth, R. E., Gras, L., de Wolf, F., Netea, M. G., Hoepelman, A. I., Athena national observational cohort Study. 2013. Lower incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among Africans in the Netherlands host or environmental factors? *AIDS* **27**:1179-84.
- Senn, L., Robinson, J. O., Schmidt, S., Knaup, M., Asahi, N., Satomura, S., Matsuura, S., Duvoisin, B., Bille, J., Calandra, T., Marchetti, O. 2008. 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis* **46**:878-85.
- Shao, P. L., Huang, L. M., Hsueh, P. R. 2007. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents* **30**:487-95.
- Sidamonidze, K., Peck, M. K., Perez, M., Baumgardner, D., Smith, G., Chaturvedi, V., Chaturvedi, S. 2012. Real-time PCR assay for identification of *Blastomyces dermatitidis* in culture and in tissue. *J Clin Microbiol* **50**:1783-6.
- Sidrim, J. J., Costa, A. K., Cordeiro, R. A., Brilhante, R. S., Moura, F. E., Castelo-Branco, D. S., Neto, M. P., Rocha, M. F. 2010. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can J Microbiol* **56**:445-58.
- Silva, A. P., Miranda, I. M., Lisboa, C., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G. 2009a. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida*

- parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. J Clin Microbiol **47**:2392-7.
- Silva, S., Henriques, M., Oliveira, R., Azeredo, J., Malic, S., Hooper, S. J., Williams, D. W.** 2009b. Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium. Eur J Oral Sci **117**:669-75.
- Sims, C. R., Jaijakul, S., Mohr, J., Rodríguez, J., Finkelman, M., Ostrosky-Zeichner, L.** 2012. Correlation of clinical outcomes with beta-glucan levels in patients with invasive candidiasis. J Clin Microbiol **50**:2104-6.
- Slany, M., Vanerkova, M., Nemcova, E., Zaloudikova, B., Ruzicka, F., Freiburger, T.** 2010. Differentiation of *Staphylococcus* spp. by high-resolution melting analysis. Can J Microbiol **56**:1040-9.
- Somogyvari, F., Horvath, A., Serly, J., Majoros, H., Vagvolgyi, C., Peto, Z.** 2012. Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. In Vivo **26**:979-83.
- Souza, A. C., Ferreira, R. C., Goncalves, S. S., Quindós, G., Eraso, E., Bizerra, F. C., Briones, M. R., Colombo, A. L.** 2012. Accurate identification of *Candida parapsilosis* (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and real-time PCR. J Clin Microbiol **50**:2310-4.
- Spreghini, E., Orlando, F., Tavanti, A., Senesi, S., Giannini, D., Manso, E., Barchiesi, F.** 2012. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. J Antimicrob Chemother **67**:2195-202.
- Srinivasan, A., Kleiman, M. B., Debelenko, L., Stokes, D. C., De Vincenzo, J., Wheat, J. L.** 2009. False-negative *Histoplasma* antigen in acute pulmonary histoplasmosis: the value of urinary concentration by ultrafiltration and heat denaturation of serum proteins in detection of *Histoplasma antigen*. Pediatr Infect Dis J **28**:447-9.
- Stevens, D. A., Clemons, K. V., Levine, H. B., Pappagianis, D., Baron, E. J., Hamilton, J. R., Deresinski, S. C., Johnson, N.** 2009. Expert opinion: what to do when there is *Coccidioides* exposure in a laboratory. Clin Infect Dis **49**:919-23.
- Sugita, T., Kodama, M., Saito, M., Ito, T., Kato, Y., Tsuboi, R., Nishikawa, A.** 2003. Sequence diversity of the intergenic spacer region of the rRNA gene of *Malassezia globosa* colonizing the skin of patients with atopic dermatitis and healthy individuals. J Clin Microbiol **41**:3022-7.
- Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T., Shinoda, T.** 2002. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. J Clin Microbiol **40**:1826-30.
- Sugita, T., Takeo, K., Ohkusu, M., Virtudazo, E., Takashima, M., Asako, E., Ohshima, F., Harada, S., Yanaka, C., Nishikawa, A., Majoros, L., Sipiczki, M.** 2004. Fluconazole-resistant pathogens *Candida inconspicua* and *C. norvegensis*: DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production. Microbiol Immunol **48**:761-6.
- Szilagyi, J., Foldi, R., Gesztelyi, R., Bayegan, S., Kardos, G., Juhasz, B., Majoros, L.** 2012. Comparison of the kidney fungal burden in experimental disseminated candidiasis by species of the *Candida parapsilosis* complex treated with

Referencias

- fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a temporarily neutropenic murine model. *Chemotherapy* **58**:159-64.
- Tasaka, S., Tokuda, H.** 2013. Recent advances in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected adults. *Expert Opin Med Diagn* **7**:85-97.
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C., Odds, F. C.** 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* **43**:284-92.
- Tavanti, A., Hensgens, L. A., Ghelardi, E., Campa, M., Senesi, S.** 2007. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol* **45**:1455-62.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., Fisher, M. C.** 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* **31**:21-32.
- Theel, E. S., Jespersen, D. J., Harring, J., Mandrekar, J., Binnicker, M. J.** 2013. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen from urine specimens. *J Clin Microbiol* **51**:3555-9.
- Thompson, G. R., Sharma, S., Bays, D. J., Pruitt, R., Engelthaler, D. M., Bowers, J., Driebe, E. M., Davis, M., Libke, R., Cohen, S. H., Pappagianis, D.** 2013. Coccidioidomycosis: adenosine deaminase levels, serologic parameters, culture results, and polymerase chain reaction testing in pleural fluid. *Chest* **143**:776-81.
- Tobon, A. M., Agudelo, C. A., Rosero, D. S., Ochoa, J. E., De Bedout, C., Zuluaga, A., Arango, M., Cano, L. E., Sampedro, J., Restrepo, A.** 2005. Disseminated histoplasmosis: a comparative study between patients with acquired immunodeficiency syndrome and non-human immunodeficiency virus-infected individuals. *Am J Trop Med Hyg* **73**:576-82.
- Tong, S. Y., Giffard, P. M.** 2012. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol* **50**:3418-21.
- Tosun, I., Akyuz, Z., Guler, N. C., Gulmez, D., Bayramoglu, G., Kaklikkaya, N., Arikankadagli, S., Aydin, F.** 2013. Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Med Mycol* **51**:483-92.
- Trevino-Rangel Rde, J., Rodríguez-Sánchez, I. P., Elizondo-Zertuche, M., Martínez-Fierro, M. L., Garza-Veloz, I., Romero-Díaz, V. J., González, J. G., González, G. M.** 2014. Evaluation of in vivo pathogenicity of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* with different enzymatic profiles in a murine model of disseminated candidiasis. *Med Mycol* **52**:240-5.
- Tschudy, J., Michail, S.** 2010. Disseminated histoplasmosis and *Pneumocystis* pneumonia in a child with Crohn disease receiving infliximab. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **51**:221-2.
- Valach, M., Prysycz, L. P., Tomaska, L., Gacser, A., Gabaldón, T., Nosek, J.** 2012. Mitochondrial genome variability within the *Candida parapsilosis* species complex. *Mitochondrion* **12**:514-9.
- Van Asbeck, E. C., Clemons, K. V., Markham, A. N., Stevens, D. A.** 2009. Correlation of restriction fragment length polymorphism genotyping with internal transcribed

- spacer sequence, randomly amplified polymorphic DNA and multilocus sequence groupings for *Candida parapsilosis*. *Mycoses* **52**:493-8.
- Vanhee, L. M., Nelis, H. J., Coenye, T.** 2010. What can be learned from genotyping of fungi? *Med Mycol* **48 Suppl 1**:S60-9.
- Veron, V., Simon, S., Carme, B.** 2009. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. *Exp Parasitol* **121**:346-51.
- Viscoli, C., Machetti, M., Cappellano, P., Bucci, B., Bruzzi, P., Van Lint, M. T., Bacigalupo, A.** 2004. False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis* **38**:913-6.
- Von Lilienfeld-Toal, M., Lehmann, L. E., Raadts, A. D., Hahn-Ast, C., Orlopp, K. S., Marklein, G., Purr, I., Cook, G., Hoeft, A., Glasmacher, A., Stuber, F.** 2009. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* **47**:2405-10.
- Waggoner, J. J., Abeynayake, J., Balassiano, I., Lefterova, M., Sahoo, M. K., Liu, Y., Vital-Brazil, J. M., Gresh, L., Balmaseda, A., Harris, E., Banaei, N., Pinsky, B. A.** 2014. A Multiplex Nucleic Acid Amplification Test for the Diagnosis of Dengue, Malaria, and Leptospirosis. *J Clin Microbiol*. doi: 10.1128/JCM.00341-14. (*En prensa*).
- Wang, X., Theodore, M. J., Mair, R., Trujillo-López, E., du Plessis, M., Wolter, N., Baughman, A. L., Hatcher, C., Vuong, J., Lott, L., von Gottberg, A., Sacchi, C., McDonald, J. M., Messonier, N. E., Mayer, L. W.** 2012. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. *J Clin Microbiol* **50**:702-8.
- Watanabe, K., Sakai, R., Koike, R., Sakai, F., Sugiyama, H., Tanaka, M., Komano, Y., Akiyama, Y., Mimura, T., Kaneko, M., Tokuda, H., Iso, T., Motegi, M., Ikeda, K., Nakajima, H., Taki, H., Kubota, T., Kodama, H., Sugii, S., Kuroiwa, T., Nawata, Y., Shiozawa, K., Ogata, A., Sawada, S., Matsukawa, Y., Okazaki, T., Mukai, M., Iwahashi, M., Saito, K., Tanaka, Y., Nanki, T., Miyasaka, N., Harigai, M.** 2012. Clinical characteristics and risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis receiving adalimumab: a retrospective review and case-control study of 17 patients. *Mod Rheumatol*. doi: 10.1007/s10165-012-0796-5. (*En prensa*).
- Westblade, L. F., Jennemann, R., Branda, J. A., Bythrow, M., Ferraro, M. J., Garner, O. B., Ginocchio, C. C., Lewinski, M. A., Manji, R., Mochón, A. B., Procop, G. W., Richter, S. S., Rychert, J. A., Sercia, L., Burnham, C. A.** 2013. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* **51**:2267-72.
- Westh, H., Lisby, G., Breyse, F., Boddingtonhaus, B., Chomarat, M., Gant, V., Goglio, A., Raglio, A., Schuster, H., Stuber, F., Wissing, H., Hoeft, A.** 2009. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect* **15**:544-51.
- Wheat, J.** 1994. Histoplasmosis and coccidioidomycosis in individuals with AIDS. A clinical review. *Infect Dis Clin North Am* **8**:467-82.
- Wheat, J.** 1995. Endemic mycoses in AIDS: a clinical review. *Clin Microbiol Rev* **8**:146-59.

Referencias

- Wheat, L. J.** 2009. Approach to the diagnosis of the endemic mycoses. *Clin Chest Med* **30**:379-89, viii.
- Wheat, L. J., Freifeld, A. G., Kleiman, M. B., Baddley, J. W., McKinsey, D. S., Loyd, J. E., Kauffman, C. A., Infectious Diseases Society of America.** 2007. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **45**:807-25.
- White, P. L., Bretagne, S., Klingspor, L., Melchers, W. J., McCulloch, E., Schulz, B., Finnstrom, N., Mengoli, C., Barnes, R. A., Donnelly, J. P., Loeffler, J., European Aspergillus PCR Initiative.** 2010. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol* **48**:1231-40.
- Wilson, J. W., Limper, A. H., Gryns, T. E., Karre, T., Wengenack, N. L., Binnicker, M. J.** 2011. *Pneumocystis jirovecii* testing by real-time polymerase chain reaction and direct examination among immunocompetent and immunosuppressed patient groups and correlation to disease specificity. *Diagn Microbiol Infect Dis* **69**:145-52.
- Wiwanitkit, V.** 2010. TaqMan real-time PCR assay for *Coccidioides*. *Med Mycol* **48**:679; author reply 680.
- Yin, X., Zheng, L., Liu, Q., Lin, L., Hu, X., Hu, Y., Wang, Q.** 2013. High-resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis. *J Clin Microbiol* **51**:3294-9.
- Zhang, X., Gibson, B., Jr., Daly, T. M.** 2013. Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of histoplasmosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* **51**:4095-101.

8. ANEXOS

ANEXO 1:

CEBADORES Y SONDAS

Características de los cebadores y sondas empleados en este trabajo. Los cebadores y sondas empleados para la detección de ADN de *Histoplasma capsulatum* están registrados bajo el número de patente PCT/ES2009070340

Nombre	Especie	Secuencia	Tamaño (pb)	Diana
OliPJMB1 (f)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	5'-CCCTAGTGTTTTAGCATTTTTTC -3'	22	ITS
OLIPJMB2 (r)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	5'-CTGCAATTCACACTACTTATCG -3'	22	ITS
PJ-MB1	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	5'-HEX- CGCGATACCTTTGGCGAGGCAAGCAAATCGCG-BHQ1-3'	32	ITS
OLI CRYPTO 1 2 (f)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5`-CCTGTTGGACTTGGATTTGG-3`	20	ITS
OLI CRYPTO 2 (r)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5`-AGCAAGCCGAAGACTACC-3`	18	ITS
MB CRYPTO	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5`-CYAN 500-CGCGATCATTACGCCGGGCTGACAGGTAATCAGATCGCG-BHQ1-3`	39	ITS
Oli1-icjf1 (f)	Jellyfish	5`-GCCTGGTGCAAAAATTGCTTATC -3`	23	Limaye
Oli2-icjf2 (r)	Jellyfish	5`-CTAAGACAAGTGTGTTTATGGTATTG-3`	26	Limaye
CIJF-MB	Jellyfish	5`-Cy5-CGCGATGCTGTTCTCCGCCACTTCCAATCGCG-BHQ2 -3`	33	Limaye
CIP-1	<i>Coccidioides spp.</i>	5`-CACCCGTGTTTACTGAAC-3`	18	ITS
CIP-2	<i>Coccidioides spp.</i>	5`-CAAAGATTCGATGATTCAC-3`	19	ITS
MB-CIP	<i>Coccidioides spp.</i>	5`-6FAM-CGCGATCTTATGTGAAGATTGTCAGTCTGAGCAGATCGCG-BHQ1-3	40	ITS
ITS-1	Universal	5`-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`	19	ITS
ITS-4	Universal	5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`	20	ITS
ITS1-100	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5`-GTGCCGAAGCACATAAACAG-3`	20	ITS
LR12R	Universal	5`-GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC-3`	22	IGS
5S3R	Universal	5`-GGCCATATCTASCAGAAAGCACCG-3`	24	IGS

Nombre	Especie	Secuencia	Tamaño (pb)	Diana
25S1F	Universal	5`-GTAGAGTAGCCTTGTTG-3`	17	IGS
psilIGS1f	<i>C.andida parapsilosis</i>	5`- TGCGGGCGAGAGCTTGC-3`	17	IGS
psilIGS1r	<i>Candida parapsilosis</i>	5`- CAATTTACCCGGCACTC-3`	17	IGS
CDC3F	<i>Candida albicans</i>	5`-CAGATGATTTTTGTATGAGAAGAA-3`	25	CDC3
CDC3R	<i>Candida albicans</i>	5`-(HEX)-CAGTCACAAGATTTAAATGTTCAAG-BHQ1-3`	25	CDC3
EF3F	<i>Candida albicans</i>	5`-TTTCCTCTCCTTTTCATATAGAA-3`	23	EF3
EF3R	<i>Candida albicans</i>	5`-(FAM)-GGATTCAGTAGCAGCAGACA-BHQ2-3`	20	EF3
HIS3F	<i>Candida albicans</i>	5`-(NED)-TGGCAAAAATGATATTCAA-BHQ2-3`	20	HIS3
HIS3R	<i>Candida albicans</i>	5`-TACACTATGCCCAAACACA-3`	20	HIS3

ANEXO 2:

**LISTADO DE CEPAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO
DE TESIS**

Características de las cepas utilizadas para la estandarización y validación de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas en este trabajo de tesis.

Nombre	Especie	Origen	Identificación
CNM-CM 7036	<i>Aspergillus alliaceus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 7169	<i>Aspergillus clavatus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3509	<i>Aspergillus flavus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 7198	<i>Aspergillus flavus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM AF237	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 7012	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 7168	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 7152	<i>Aspergillus lentulus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3551	<i>Aspergillus niger</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 7033	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3508	<i>Aspergillus terreus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 7082	<i>Aspergillus terreus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3113	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3114	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3115	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3192	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CL 5719	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7426	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7449	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7470	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7471	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7478	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7484	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7498	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7499	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7503	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7504	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7513	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7617	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7624	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7620	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7640	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7643	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7683	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7694	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7705	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7712	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 6188	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 6361	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 6373	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 6399	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 6431	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 6488	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 6714	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular

Nombre	Especie	Origen	Identificación
CNM-CL 7019	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7020	<i>Candida albicans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 5533	<i>Candida glabrata</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7127	<i>Candida guilliermondii</i>	Clínico	Molecular
NCPG 3099	<i>Candida guilliermondii</i>	Colección	Molecular
CNM-CL 7057	<i>Candida krusei</i>	Clínico	Molecular
ATCC 96144	<i>Candida metapsilosis</i>	Colección	Molecular
CNM CL 4438	<i>Candida metapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 4638	<i>Candida metapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 4886	<i>Candida metapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 4926	<i>Candida metapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 5144	<i>Candida metapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 5221	<i>Candida metapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 8774	<i>Candida metapsilosis</i>	Clínico	Molecular
ATCC 96139	<i>Candida orthopsilosis</i>	Colección	Molecular
CNM-CL 6823	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7045	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7261	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7270	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7716	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7778	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 8066	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 8157	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 8273	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 8282	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 8292	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 8601	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 8840	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL5683	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	Colección	Molecular
CNM-CL 6886	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7000	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7036	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7038	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7054	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7113	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7146	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7491	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7625	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7034	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 5742	<i>Candida tropicalis</i>	Clínico	Molecular
CNM-CM-7056	<i>Coccidioides immitis</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 2912	<i>Coccidioides posadasii</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM-2911	<i>Coccidioides posadasii</i>	Clínico	Morfológica/Molecular

Nombre	Especie	Origen	Identificación
Silveira (ATCC28898)	<i>Coccidioides posadasii</i>	Colección	Morfológica/Molecular
CIMR 98-82	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 98-84	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 98-118	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 98-138	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 01-226	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 05-104	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 08-29	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 11-46	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 97-203	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 98-81	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 98-83	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 98-128	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 98-137	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 05-97	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 05-103	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 10-117	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 01-251	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 99-35	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CIMR 98-30	<i>Coccidioides spp.</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CBS 10865	<i>Cryptococcus gattii</i>	Colección	Molecular
NIH 191	<i>Cryptococcus gattii</i>	Colección	Molecular
NIH 34	<i>Cryptococcus gattii</i>	Colección	Molecular
NIH 198	<i>Cryptococcus gattii</i>	Colección	Molecular
CNM-CL 4998	<i>Cryptococcus gattii</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 5007	<i>Cryptococcus gattii</i>	Clínico	Molecular
CBS10496	<i>Cryptococcus híbridos A/B</i>	Colección	Molecular
CNM-CL 3796	<i>Cryptococcus híbridos A/D</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 3797	<i>Cryptococcus híbridos A/D</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 3825	<i>Cryptococcus híbridos A/D</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 3826	<i>Cryptococcus híbridos A/D</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 4840	<i>Cryptococcus híbridos A/D</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 6434	<i>Cryptococcus híbridos A/D</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 7041	<i>Cryptococcus híbridos A/D</i>	Clínico	Molecular
CBS 10489	<i>Cryptococcus híbridos B/D</i>	Colección	Molecular
CBS10490	<i>Cryptococcus híbridos B/D</i>	Colección	Molecular
CNM-CL 2132	<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 3798	<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 4018	<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	Clínico	Molecular
H99	<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	Colección	Molecular
CNM-CL 5750	<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 4978	<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 5539	<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 2132	<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i>	Clínico	Molecular

Nombre	Especie	Origen	Identificación
CNM-CL 3801	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 4392	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Clínico	Molecular
CNM-CL 4839	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Clínico	Molecular
24067	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Colección	Molecular
B 3501	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Colección	Molecular
CNM-CM 2914	<i>Fusarium oxysporum</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3035	<i>Fusarium solani</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 2975	<i>Fusarium verticillioides</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 2721	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CL 8161	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	Clínico	Molecular
CNM-CM 2437	<i>Mucor circinelloides</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 2908	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3020	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 4244	<i>Rhizopus microsporum</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 3169	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Clínico	Morfológica/Molecular
CNM-CM 1627	<i>Scedosporium prolificans</i>	Clínico	Morfológica/Molecular

CNM-CL: Colección de Levaduras del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología. **CNM-CM.**: Colección de hongos miceliales del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología. **CBS**: Fungal Biodiversity Center. **NIH**: National Institute for Health. **ATCC**: American type Culture Collection.

ANEXO 3:

**NÚMEROS DE ACCESO DE LAS SECUENCIAS
DEPOSITADAS EN GENBANK**

Aislados y Cepas de Referencia cuyas secuencias de las regiones ITS se han depositado en la base de datos de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Cepa	Origen clínico	Especie	Diana	Identificador GenBank
ATCC 96144	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	ITS	KF313194
CNM CL 4438	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	ITS	KF313187
CNM-CL 4638	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	ITS	KF313188
CNM-CL 4886	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	ITS	KF313189
CNM-CL 4926	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	ITS	KF313190
CNM-CL 5144	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	ITS	KF313191
CNM-CL 5221	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	ITS	KF313192
CNM-CL 8774	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	ITS	KF313216
ATCC 96139	Desconocido	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313193
CNM-CL 6823	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313195
CNM-CL 7045	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313200
CNM-CL 7261	Unknown	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313200
CNM-CL 7270	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313204
CNM-CL 7716	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313208
CNM-CL 7778	Absceso peritoneal	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313209
CNM-CL 8066	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313210
CNM-CL 8157	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313211
CNM-CL 8273	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313212
CNM-CL 8282	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313213
CNM-CL 8292	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313214
CNM-CL 8601	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313215
CNM-CL 8840	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	ITS	KF313217
ATCC 22019	Desconocido	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313185
CNM-CL 6886	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313196
CNM-CL 7000	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313197
CNM-CL 7036	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313198
CNM-CL 7038	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313199
CNM-CL 7054	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313201
CNM-CL 7113	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313218
CNM-CL 7146	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313202
CNM-CL 7491	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313205
CNM-CL 7625	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313206
CNM-CL 7034	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	KF313207
NCPG 3099	Desconocido	<i>Candida guilliermondii</i>	ITS	KF313186
CNM-CM 2912	Biopsia	<i>Coccidioides posadasii</i>	ITS	KF700275
CNM-CM 2911	Biopsia	<i>Coccidioides posadasii</i>	ITS	KF700274
CNM-CM 7056	Biopsia	<i>Coccidioides immitis</i>	ITS	KF700276

Aislados y Cepas de Referencia cuyas secuencias de las regiones IGS-1 se han depositado en la base de datos de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Cepa	Origen clínico	Especie	Diana	Identificador GenBank
ATCC 96144	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	IGS-1	KF313156
CNM CL 4438	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	IGS-1	KF313152
CNM-CL 4638	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	IGS-1	KF313157
CNM-CL 4886	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	IGS-1	KF313158
CNM-CL 4926	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	IGS-1	KF313159
CNM-CL 5144	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	IGS-1	KF313153
CNM-CL 5221	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	IGS-1	KF313154
CNM-CL 8774	Hemocultivo	<i>Candida metapsilosis</i>	IGS-1	KF313155
ATCC 96139	Desconocido	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313177
CNM-CL 6823	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313175
CNM-CL 7045	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313176
CNM-CL 7261	Unknown	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313173
CNM-CL 7270	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313178
CNM-CL 7716	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313171
CNM-CL 7778	Absceso peritoneal	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313174
CNM-CL 8066	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313172
CNM-CL 8157	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313179
CNM-CL 8273	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313184
CNM-CL 8282	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313181
CNM-CL 8292	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313182
CNM-CL 8601	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313180
CNM-CL 8840	Hemocultivo	<i>Candida orthopsilosis</i>	IGS-1	KF313183
ATCC 22019	Desconocido	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313165
CNM-CL 6886	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313169
CNM-CL 7000	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313162
CNM-CL 7036	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313170
CNM-CL 7038	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313167
CNM-CL 7054	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313161
CNM-CL 7113	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313166
CNM-CL 7146	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313168
CNM-CL 7491	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313160
CNM-CL 7625	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313164
CNM-CL 7034	Hemocultivo	<i>Candida parapsilosis</i>	IGS-1	KF313163
NCPG 3099	Desconocido	<i>Candida guilliermondii</i>	IGS-1	KF313151

ANEXO 4:

TABLAS Y FIGURAS

Índice de tablas y figuras:

Figura 1: Estimación de los casos de infección fúngica invasora por año.

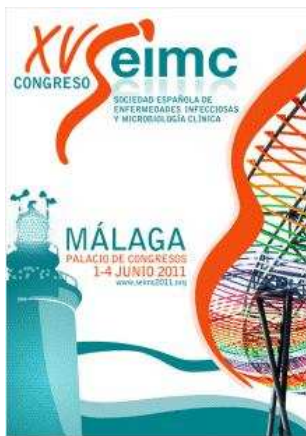
Figura 2: Organización del ADN ribosómico.

Figura 3: Representación esquemática del análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM) para la determinación de polimorfismos de una sola base.

Tabla 1: Publicaciones más relevantes de los estudios de validación de PCR en tiempo real para el diagnóstico de IFI, en los últimos diez años.

ANEXO 5:
COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DEL
TRABAJO DE TESIS

Comunicaciones a congresos Nacionales:



CONGRESO: XV Congreso SEIMC, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Málaga, 1-4 Junio 2011.

PRESENTACIÓN: *Poster: Identificación de las variedades de Cryptococcus neoformans y Cryptococcus gattii mediante High Resolution Melting. (P-276)*

AUTORES: Sara Gago, María José Buitrago Serna, Óscar Zaragoza Hernández, Isabel Cuesta de La Plaza, Juan Luis Rodríguez-Tudela y Manuel Cuenca-Estrella. Málaga, Spain.

Introducción: Las infecciones fúngicas debidas a *Cryptococcus* spp. afectan a individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes. En la etapa post-sida, *C. neoformans* sigue siendo una amenaza para la salud de pacientes inmunodeprimidos no solo en pacientes HIV+, también en pacientes afectados con otro tipo de inmunosupresión. Además, su incidencia en países en vías de desarrollo sigue siendo muy significativa. La especie relacionada *C. gattii* afecta principalmente a individuos inmunocompetentes, y ha sido descrita como el agente causante de brotes en Canadá y EEUU. *C. neoformans* clásicamente ha sido dividido en 5 serotipos (A, B, C, D y AD) que se han agrupado en dos variedades de *C. neoformans*, var. *grubii* (serotipo A) y var. *neoformans* (serotipo D). Los serotipos B y C han sido considerados recientemente como la especie *Cryptococcus gattii*. Además, se ha descrito la existencia de híbridos AD, BD y BA.

Objetivos: Desarrollo de una técnica rápida que permita diferenciar variedades de *Cryptococcus* spp. mediante análisis de High Resolution Melting (HRM).

Material y métodos: Las reacciones de PCR y el análisis de HRM se llevaron a cabo en el equipo LightCycler 480 II (Roche Applied Science). Se diseñaron iniciadores en la región de ITS-1 (Internal Transcribed Spacer-1) del ADN ribosomal para amplificar una región de 110pb. Se optimizaron las condiciones de PCR y se analizaron mediante HRM los productos obtenidos empleando ADN de 24 cepas de *Cryptococcus* spp. de la colección del Servicio de Micología. Simultáneamente se secuenciaron los fragmentos amplificados.

Resultados: Un procedimiento de doble análisis mediante HRM del producto de PCR de las 24 cepas de *Cryptococcus* spp., permitió la discriminación de 4 grupos que se correspondían con las variedades *neoformans* e híbridos AD (10 cepas), var. *grubii* (6 cepas), var. *gattii* (3 cepas) e híbridos BD y AB (5 cepas). Los resultados de estos grupos se correspondían con las posiciones de *mismatch* en la secuencia del fragmento obtenido para cada cepa. Tan solo la cepa CL-5007 agrupada inicialmente como var. *gattii*, fue agrupada con los híbridos BD y AB mediante análisis de secuencia y HRM.

Conclusiones: (i) El análisis mediante HRM de los productos de PCR es un método rápido y sencillo que puede ser útil para la diferenciación de variedades de *Cryptococcus* spp. (ii) Los híbridos AD en el fragmento analizado son semejantes en

Anexos

secuencia a la var. *neoformans*. (iii) La primera fase del análisis permite la discriminación de *C. gattii* del complejo *C. neoformans*. (iv) Deben realizarse nuevos estudios con un mayor número de cepas.



CONGRESO: V Fórum Micológico. Alicante, 25 y 26
Noviembre 2011.

PRESENTACIÓN: *Oral:* Análisis de microsatélites mediante High Resolution Melting en un caso de candiduria recurrente por *C. albicans* (CO-1).

AUTORES: Sara Gago, Isabel Cuesta, Belén Lorenzo, Alicia Gómez-López, Juan Luis Rodríguez-Tudela, Manuel Cuenca-Estrella y María José Buitrago.

Antecedentes: Las infecciones recurrentes debidas a *C. albicans* son frecuentes en los casos de vaginitis y candidiasis orofaríngea; y los estudios de genotipado demuestran que en la mayoría de los casos todos los episodios se deben a cepas clonales que sufren procesos de microevolución. Una de las técnicas de tipificación más empleadas en la actualidad es el análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar, técnica que presenta un gran poder de discriminación y alta reproducibilidad aunque el coste por muestra es elevado. Recientemente se ha señalado que el desarrollo de técnicas basadas en High Resolution Melting (HRM) podría resultar de interés para el análisis de microsatélites.

Objetivos: Evaluar la utilidad de las técnicas de HRM para caracterizar microsatélites de 9 aislamientos de *C. albicans* de un paciente con candiduria recurrente.

Métodos: Se analizaron 9 aislados de *C. albicans* de un paciente con candiduria recurrente durante 5 años. Se seleccionaron 3 marcadores previamente descritos (HIS 3, EF 3 y CDC 3) y se analizaron mediante electroforesis capilar y HRM. El análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar se realizó siguiendo la metodología publicada por Botterell *et al.* (2001). Para ello, se incluyeron 20 cepas no relacionadas geográficamente como población control y los electrogramas se resolvieron con el programa GenMapper 4.0. Para el análisis de HRM, tras la amplificación las curvas fueron delineadas en presencia de ResoLight® (Roche, Madrid, España) tras un ciclo de desnaturalización/renaturalización en Light Cyler 450® (Roche, Madrid, España). Como población control se seleccionaron 7 cepas que habían presentado perfiles diferentes mediante la metodología de electroforesis capilar. El poder de discriminación de ambos métodos se calculó según el índice de biodiversidad de Simpson.

Resultados: El poder de discriminación de los tres marcadores mediante electroforesis capilar fue de 0.92 siendo el marcador CDC 3 el que presentaba menor capacidad de discriminación. Las cepas del episodio de candiduria recurrente presentaron el mismo perfil y diferente al de la población control para los tres marcadores, de modo que para HIS 3 y CDC 3 eran homocigotas y heterocigotas para el marcador EF 3. En el análisis de HRM en todos los casos, salvo la cepa CNM-CL 7020 con el marcador CDC 3, las cepas procedentes del paciente con episodio de candiduria recurrente formaron un cluster único a pesar de que el poder de discriminación de los tres marcadores fue

Anexos

menor (0.77). Mediante secuenciación se pudo comprobar que la cepa CL 7020 presentaba una inserción que no era capaz de discriminar la electroforesis capilar.

Conclusiones: (i) Según ambos análisis, las cepas que causaron los episodios de candiduria recurrente están relacionadas genéticamente, (ii) el análisis de microsatélites mediante HRM es una técnica rápida y sencilla para establecer relaciones entre cepas de *C. albicans* (iii) se realizarán más estudios con un mayor número de cepas.

Bibliografía:

Botterel, F., C. Desterke, C. Costa, and S. Bretagne. 2001. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4076-4081.



CONGRESO: XI Congreso Nacional de Micología.
Cádiz, 20-22 Septiembre 2012.

PRESENTACIÓN: *Oral:* **Identificación molecular de especies del complejo psilosis mediante análisis de High Resolution Melting (HRM) basado en la región intergénica del DNA ribosomal IGS-1 (CO-1).**

AUTORES: Sara Gago, Ana Alastruey-Izquierdo, María José Buitrago, Manuel Cuenca-Estrella e Isabel Cuesta.

Desde la definición en 2005 del complejo de especies *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*)⁽¹⁾ la epidemiología de estas especies ha cobrado importancia. La presencia de un patrón de sensibilidad a los antifúngicos disponibles, diferente entre las especies del complejo, pone de manifiesto la necesidad de una identificación precisa. Además, la prevalencia de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* difiere entre autores, señalándose a *C. orthopsilosis* como la quinta causa de fungemia en nuestro país⁽²⁾ Aunque se dispone de gran número de técnicas de identificación molecular, la mayoría son poco reproducibles, emplean marcadores filogenéticos con bajo poder de resolución o presentan escasa sensibilidad para ser útiles en diagnóstico.

El objetivo de este trabajo fue (i) demostrar la utilidad de la región IGS-1 del rDNA para la identificación de especies del complejo *psilosis* y (ii) el desarrollo de una metodología rápida de identificación mediante HRM basado en esta región.

Se analizaron las secuencias de la región ITS e IGS-1 del rDNA de 32 cepas del complejo *psilosis* de la colección del Centro Nacional de Microbiología incluyéndose como cepas de referencia *C. parapsilosis* ATCC22019, *C. orthopsilosis* ATCC96139 y *C. metapsilosis* ATCC96144. Aunque ambas regiones coinciden en la clasificación a nivel de especie, la divergencia en secuencia de la región IGS1 es muy superior a la de la región ITS, convirtiéndola en un marcador filogenético alternativo a la ITS hasta ahora considerado como *gold standard*. Sin embargo, la complejidad de esta región debida a la gran abundancia de homopolímeros dificulta su secuenciación, por lo que se desarrolló un método alternativo para su análisis basado en HRM (High Resolution Melting). Se diseñó una pareja de primers en IGS-1 que permitieron amplificar un fragmento de 73 pb. Tras el proceso de amplificación, las curvas fueron normalizadas y todas las cepas se agruparon correctamente con un intervalo de confianza superior al 98%. Nuestros resultados sugieren que el análisis mediante HRM de la región IGS constituye una herramienta rápida y precisa de identificación de las especies estrechamente relacionadas que componen el complejo *psilosis*.

(1) Tavanti A *et al.* J. Clin. Microbiol. (2005), 43: 284-292.

(2) Pemán J *et al.* J Antimicrob Chemother. (2012), 67:1181-1187.

Comunicaciones a congresos internacionales:

CONGRESO: 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, 27-30 April 2013.

PRESENTACIÓN: *Poster: Diagnosis of fungal opportunistic pneumonia in hiv patients by real time PCR (P-1490).*

AUTORES: Sara Gago, Cristina Esteban, Óscar Zaragoza, Clara Valero, Jorge Puig de la Bellacasa, Manuel Cuenca-Estrella y María José Buitrago.

Objective: Pneumocystis pneumonia, histoplasmosis and cryptococcosis are three of the most frequent causes of fungal opportunistic pneumonia in AIDS patients. A molecular diagnostic technique based on Real Time PCR was developed for the simultaneous detection of *Pneumocystis jiroveci*, *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans-gattii* spp. This technique was tested in cultured strains and clinical samples from HIV patients.

Methods: A multiplex real time PCR assay was developed for the simultaneous detection of the fungal species described above. The methodology used was species-specific molecular beacon probes targeting the ITS region of the rDNA. An internal control was also included in the assay. Since *P. jiroveci* cannot grow under laboratory conditions, a fragment of 175 bp was cloned in a P-GEMt plasmid and used as positive control. For *H. capsulatum* and *C. neoformans-gattii*, genomic DNA from strains belonging to the collection of the Spanish National Centre for Microbiology were used as standard. The Multiplex Real Time PCR assay was tested in 24 clinical strains and 28 clinical samples from AIDS patients with proven histoplasmosis, cryptococcosis or pneumocystis pneumonia.

Results: The technique developed had high reproducibility ($r > 0.98$) and specificity (100%). No PCR inhibition was detected. For *H. capsulatum* and *C. neoformans-gattii*, the detection limit of the method was 1 fg of genomic fungal DNA per microliter of sample while for *P. jiroveci* was 2.92 Log₁₀ copies/microliter. The sensitivity was 100% for clinical strains and 92.6% for clinical samples. *H. capsulatum* DNA was detected in bronchoalveolar lavage, bronchi aspirate, bone marrow, biopsies and whole blood from 8/10 patients (Ct ~ 28), *C. neoformans-gattii* was detected in cerebrospinal fluid from two patients (Ct ~ 40) and *P. jiroveci* was detected in 16 BAL from 16 patients (Ct ~ 31). For one of the patients with proven histoplasmosis, *Pneumocystis jiroveci* was also detected in bronchi aspirate.

Anexos

Conclusions: (i) This multiplex real time PCR technique is fast, sensitive and specific (ii) It can be useful for the clinical diagnosis of fungal opportunistic pneumonia in AIDS patients and it could also reduce morbidity and mortality associated to an inadequate therapy. (iii) Further studies are warranted.



CONGRESO: 6th Trends in Medical Mycology. Copenhagen, 11-14 October 2013.

PRESENTACIÓN: Poster: Development and validation of a quantitative Real-Time PCR assay for the early diagnosis of coccidioidomycosis.

AUTORES: Sara Gago, María José Buitrago, Karl V. Clemons, Manuel Cuenca-Estrella y David A. Stevens.

Objectives: Coccidioidomycosis is endemic in the southwestern United States and Latin America. Although primary disease is self-limited, coccidioidomycosis also presents with disseminated disease, especially in immunocompromised patients. Early diagnosis of coccidioidomycosis is difficult, as most clinical signs are non-specific, and cultures often negative. Moreover, serology may be also negative, especially early after infection or not indicative of acute infection. Thus, the development of molecular methods for early diagnosis is needed. The aim of this study was the development of a Real-Time PCR assay for the early diagnosis of coccidioidomycosis, and validation of the assay in a murine model of disseminated infection.

Methods: A Real-Time PCR (RT-PCR) was developed for the detection of *Coccidioides immitis* and *C. posadasii* DNA. Specific primers and a molecular beacon probe were designed to amplify 267 bp from the ITS2 region of the rDNA. An internal control, based on a jellyfish-derived sequence, was also included in each assay. Standard curves were constructed with PCR results from 5 repetitions of 10-fold dilutions of genomic DNA ranging from 1 ng to 1 fg/ μ l from *C. immitis* (CNM-CM 7056) and *C. posadasii* (CNM-CM 2912), belonging to the mould collection of the Spanish National Center for Microbiology, and *C. posadasii* strain Silveira. The specificity of the assay was assessed using DNA from 10 unrelated clinical *Coccidioides* spp. strains and DNA from 17 other fungal species, and also mouse and human DNA. A murine model of disseminated coccidioidomycosis was used for RT-PCR validation. Female 5-week-old CD-1 mice were infected iv with 250 arthroconidia of *C. posadasii* strain Silveira. Fungal burdens were determined by CFU and RT-PCR in spleen, lung, and liver on days 5, 10 and 14 days postinfection. Uninfected mice served as controls. CFU and CE (conidia equivalent) values were correlated.

Results: The RT-PCR assay showed high reproducibility ($r > 0.99$) and specificity (100%); the lower detection limit was 1 fg of genomic DNA per microliter of sample. Fungal burdens after 5, 10, and 14 days of infection were higher by RT-PCR than by CFU enumeration for all tissues analyzed; RT-PCR was negative for blood on those days. No PCR inhibition was detected. Spearman correlations of RT-PCR and CFUs results showed a significant correlation for lungs ($p < 0.05$) but not for liver or spleen ($p > 0.05$). Comparative linear regression analysis of RT-PCR and CFUs showed similar slopes ($p > 0.05$) for temporal burden of infection in all organs, indicating RT-PCR, while more sensitive, is equivalent to CFU for disease progression. .

Conclusions: We have demonstrated the utility of a fast, sensitive, and specific RT-PCR for the detection of coccidioidomycosis in clinical samples from mice. RT-PCR appeared to better reflect the progression of infection. Further studies are warranted.

