

Diagnóstico micológico: del examen directo a los métodos moleculares

Mycological diagnosis: From direct smear to molecular methods

Andrea Arango¹, Natalí Moreno²

1. Médica, residente, tercer año de Dermatología, Universidad CES, Sabaneta, Colombia
2. Bacterióloga, candidata a M.Sc. en Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Resumen

Las infecciones fúngicas han asumido un papel cada vez más importante en la práctica clínica actual. Las claves para su diagnóstico radican, no sólo en una correcta anamnesis y examen físico, sino también, en los métodos diagnósticos complementarios; sin embargo, esto puede ser difícil, debido al reducido número de microorganismos en las lesiones y al lento crecimiento de algunos de ellos.

Por esta razón, se están produciendo avances importantes para la identificación rápida y específica de los agentes etiológicos, por medio de métodos moleculares y detección serológica de antígenos y anticuerpos fúngicos; algunos de estos métodos se están implementando ya en nuestro medio, por lo que el objetivo de esta revisión fue describir, no sólo los métodos convencionales, sino todas aquellas técnicas que faciliten el diagnóstico oportuno de las infecciones fúngicas.

PALABRAS CLAVE: medios de cultivo, micosis, técnicas y procedimientos de laboratorio, reacción en cadena de la polimerasa.

Summary

Fungal infections have assumed an increasingly important role in current clinical practice. The keys to diagnosis is not only a correct history and physical examination, but also conventional diagnostic methods, but this may be difficult, due to the scanty number of microorganisms in the lesions and the slow growth of some of them.

Therefore, important progress is being made, resulting in a rapid and specific identification of etiological agents through molecular and serological detection of fungal antigens and antibodies; some of these methods are being implemented in our country, thus, the objective of this review was to describe not only the conventional methods, but all those techniques that facilitate early diagnosis of fungal infections.

KEY WORDS: Culture media, mycoses, laboratory techniques and procedures, polymerase chain reaction.

Correspondencia:

Andrea Arango
Email: andrearango84@hotmail.com

Recibido: 3 de marzo de 2011.

Aceptado: 14 de septiembre de 2011.

No se reportan conflictos de intereses.

Introducción

Las infecciones fúngicas han asumido un papel cada vez más importante en la práctica clínica actual, debido al aumento del número de pacientes inmunosu-

primidos¹ y a las altas tasas de resistencia a los medicamentos antifúngicos. Por ello, en las últimas décadas se ha visto un notorio incremento en la incidencia de infecciones fúngicas superficiales y profundas, cada vez de mayor gravedad²⁻⁴.



FIGURA 1. Almacenamiento de la muestra en caja de Petri.



FIGURA 2. Recolección de muestra en lesión con descamación.



FIGURA 3. Recolección de muestra en paciente con onicomicosis lateral distal.

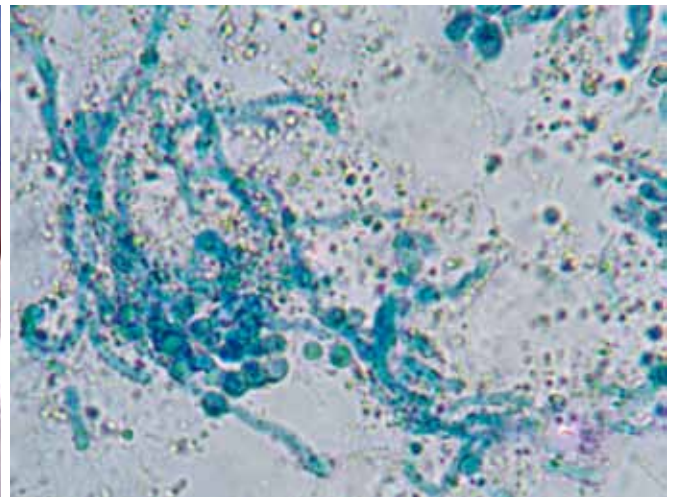


FIGURA 4. *Malassezia furfur*, tinción con KOH.

Las claves para su diagnóstico radican en una correcta anamnesis, un buen examen físico y una acertada sospecha epidemiológica, principalmente en los casos de micosis en áreas endémicas; además de esto, los métodos diagnósticos complementarios son fundamentales, teniendo siempre en cuenta su práctica oportuna, la correcta toma de la muestra, el adecuado transporte, observación, cultivo e identificación del agente etiológico^{5,6}.

Para hacer una adecuada toma de la muestra, se recomienda la correcta preparación del paciente; esta es una etapa muy importante del estudio y tiene por finalidad reducir al máximo la presencia de microorganismos contaminantes o colonizadores, y evitar las sustancias extrañas que interfieran en la observación microscópica. La preparación consiste en suspender todo medicamento sistémico o tópico con acción antifúngica, diez

a quince días antes de la obtención de la muestra; asimismo, suspender la aplicación de pomadas, cremas, esmaltes o polvos sobre la piel y uñas afectadas, tres a cinco días antes de la toma de la muestra; la zona se debe lavar sólo con agua y jabón de tocador; en el caso de las uñas, se recomienda no cortarlas en la semana anterior a la obtención de la muestra y, si la zona afectada son los pies, después del último baño se recomienda utilizar zapato cerrado y medias, cuidando que no tengan restos de talco⁷. Luego de estas indicaciones, y una vez observadas las mismas, se procede a la recolección del material, cuya técnica varía según la localización de la lesión, como se verá más adelante.

La recolección de la muestra es igualmente importante; no se deben emplear contenedores plásticos para su almacenamiento, ya que se puede adherir a las paredes de los mismos, lo que dificulta su recuperación;

de igual manera, el uso de portaobjetos de cristal tiene el riesgo de pérdida del material por ruptura del vidrio durante el transporte. El material obtenido se almacena adecuadamente en un sobre o directamente en una caja de Petri (**FIGURA 1**)⁸.

Según las características de la lesión clínica, varía también el método de recolección; cuando es una lesión con descamación, se debe raspar el borde activo con un bisturí, debido a que allí se encuentra una mayor cantidad de elementos fúngicos viables, y cuando existen lesiones satélites (por ejemplo, en la candidiasis), el raspado se hace en dichas lesiones por ser las de más reciente aparición (**FIGURA 2**)^{8,9}.

Otra técnica empleada en la recolección de escamas, es la de la cinta pegante; para esta se aplica la cara adhesiva de ésta sobre la piel que se va a estudiar, presionando enérgicamente; luego se despega y se coloca sobre el portaobjetos. Este método es particularmente útil en los pacientes con pitiriasis versicolor parcialmente tratada, en la que la descamación es escasa¹⁰.

Cuando nos enfrentamos a una lesión exudativa, no se debe raspar porque sería un procedimiento cruento, sino recoger el material con un aplicador estéril. Si la muestra no se va a procesar inmediatamente, se prefiere utilizar un aplicador con medio de transporte húmedo, ya que las levaduras pierden rápidamente la viabilidad en los hisopos secos.

En las tiñas del cuero cabelludo o de la barba, es importante obtener los pelos arrancándolos con la raíz intacta, ya que si se cortan, disminuye la sensibilidad de la prueba; en las piedras (blanca o negra), que son infecciones fúngicas confinadas a la vaina del pelo, se debe cortar la porción suprafolicular de los pelos enfermos⁸.

En las onicomiasis, la toma de muestras también varía en función del tipo de lesión clínica. En la onicomiasis subungular lateral y distal, se debe recolectar el material con bisturí y, además, cortar un fragmento de la parte más proximal de la uña, la cual aunque es menos accesible, también es la menos contaminada y contiene los elementos fúngicos más jóvenes y viables (**FIGURA 3**)¹¹. Esta misma técnica es la empleada al momento de recolectar muestras en pacientes con onicomiasis subungular proximal y distrófica total. En aquellos casos en los cuales la onicomiasis se acompaña de paroniquia crónica, se obtiene el material ungular más cercano a la cutícula, raspando con bisturí al igual que en los casos anteriores, pero, además, con un hisopo estéril se debe obtener muestra de la secreción asociada haciendo una pequeña incisión y posterior compresión de la porción lateral del dedo. En la onicomiasis blanca superficial, no hay material subungular por lo cual, para obtener la muestra, sólo se raspa con el bisturí la superficie de la placa ungular afectada⁹.

El estudio micológico clásico por observación, análisis e interpretación del examen microscópico directo de la muestra, permite plantear un diagnóstico presuntivo rápido y la instauración de un tratamiento precoz, sin tener que esperar el crecimiento de los cultivos; además, en algunos casos permite hacer un diagnóstico definitivo, como es el caso de la pitiriasis versicolor, la paracoccidiodomicosis y la criptococosis, que tienen hallazgos microscópicos característicos¹². Se efectúa en fresco, con sustancias que favorecen la disgregación de la queratina y aclaran la preparación. Estas sustancias facilitan la visualización de las estructuras fúngicas (micelios, esporas o levaduras) por su alto índice de refracción. Sin embargo, tiene como principal desventaja su baja sensibilidad y su incapacidad, en la mayoría de los casos, para identificar la especie del microorganismo patógeno. Por esta razón, con un examen microscópico negativo no podemos afirmar que el paciente no tiene infección¹³.

Son múltiples las técnicas de observación microscópica disponibles, entre ellas, la más comúnmente utilizada ha sido el hidróxido de potasio (KOH) al 10 % o al 20 % con tinta Parker®, con dimetilsulfóxido o sin él^{14,15}. El hidróxido de potasio es queratolítico, por lo cual digiere el material proteico, aclara los pigmentos y separa las células, lo que permite observar los elementos fúngicos presentes. Es muy útil para muestras de piel y para todas aquellas que contengan células epiteliales. En los pacientes con sospecha de pitiriasis versicolor, se puede hacer el diagnóstico definitivo ya que *Malassezia furfur* se tiñe intensamente de color azul y se observa una imagen de “espaguetis y albóndigas” la cual es patognomónica de esta enfermedad y no requiere de cultivos ni otras pruebas diagnósticas adicionales (**FIGURA 4**).

Al momento de interpretar los resultados del examen directo, debemos ser cuidadosos debido a que, frecuentemente, artefactos como burbujas de aire o restos de algodón o medicamentos tópicos previos, que contaminaron la muestra al momento de su recolección, pueden verse microscópicamente muy similares a levaduras o hifas y, por consiguiente, el observador puede dar resultados errados. Otra causa de error es el “efecto mosaico”, el cual se presenta en muestras con mucha queratina y se produce por acúmulos de lípidos que se asemejan a estructuras fúngicas y que desaparecen al flamear la preparación. Otro método comúnmente utilizado para la visualización en fresco de las muestras, es el examen directo con solución salina, en el cual se agrega una gota a la muestra en un portaobjetos; las estructuras fúngicas se observan brillantes y ligeramente verdosas, y en el caso de las levaduras pueden aparecer con inclusiones¹⁶.

La visualización con blanco calcoflúor, se hace co-

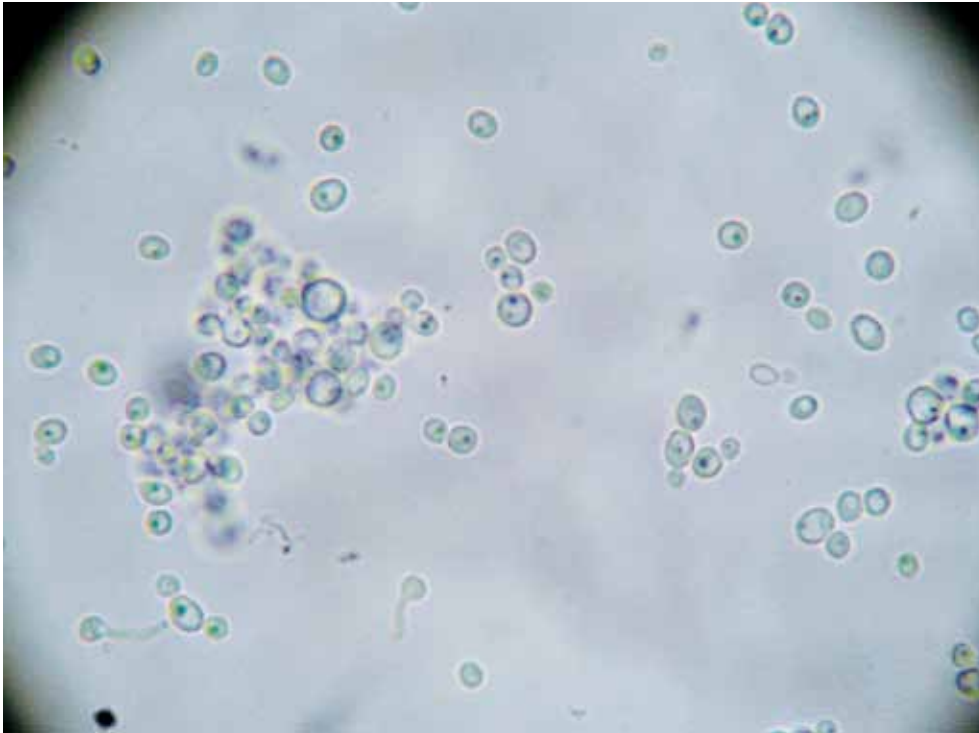


FIGURA 5. Prueba positiva por presencia de tubos germinales.

locando un poco de la muestra con una gota de KOH sulfóxido dimetilo más una gota de calcoflúor. Después de varios minutos se produce la clarificación. Con esta técnica se tiñen los polisacáridos de la pared de los hongos (verde brillante o blanco azulado) y es más sensible que la microscopía óptica clásica en fresco con KOH, pero tiene como desventaja que exige el uso de un microscopio de fluorescencia, el cual no está disponible en todos los laboratorios¹⁷. Finalmente, y no por esto menos importante, tenemos la tinción con azul de lactofenol, la cual es muy útil para preparaciones a partir de cultivos. En ella, el fenol destruye la flora acompañante; el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas y el azul tiñe la quitina de las paredes del hongo.

Otras tinciones que se han utilizado para la identificación de los hongos son la de Gram y la de plata metenamina (*periodic acid-Schiff*, PAS) son procedimientos rápidos y sencillos y el último es específico para hongos; permiten la apreciación de diferentes estructuras según la variación de su contenido de polisacáridos. De esta manera, las estructuras fúngicas suelen ser Gram positivas y se tiñen de morado claro con la tinción de PAS. Estas tinciones se utilizan, principalmente, para muestras de tejidos obtenidas por biopsia¹⁸.

Sin embargo, a pesar de la rapidez para obtener un diagnóstico presuntivo mediante la observación microscópica directa, el fundamento del diagnóstico etiológico de todo proceso infeccioso es el cultivo de

la muestra, el cual permite aislar e identificar el microorganismo causal y hacer las pruebas de sensibilidad antimicrobiana¹³.

Para el cultivo, se pueden emplear desde tubos cerrados hasta cajas de Petri. La mayor área de superficie de estas últimas, facilita el aislamiento y la dilución de sustancias inhibitorias en las muestras; sin embargo, las cajas se contaminan con facilidad durante la incubación, por lo que es aconsejable sellarlas con cinta adhesiva, mientras que los medios en tubo, por su parte, tienen la ventaja de que no se deshidratan y se contaminan menos, pero en cambio, tienen menos superficie.

El medio de cultivo se debe seleccionar según la sospecha etiológica y el tipo de muestra. En micosis superficiales, los medios habituales para aislar los hongos son el agar con glucosa de Sabouraud y el agar con glucosa de Sabouraud con cicloheximida (actidiona) y cloranfenicol. Este último es de elección para el aislamiento de hongos a partir de muestras muy contaminadas con hongos saprofitos y bacterias¹⁹. Sin embargo, hay algunas especies patógenas que también pueden ser inhibidas (*Candida no albicans*, *Scytalidium* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp., entre otros); por esta razón, es importante siempre emplear medios con agentes inhibidores y sin ellos¹².

Al hacer la siembra, siempre se debe utilizar toda la muestra. En caso de aspirado de abscesos, el volumen debe ser mayor de 2 ml. Cuando la muestra es pelos y

raspados, se deben depositar directamente en el medio, presionando para que queden adheridos; en el caso de las uñas, se pueden pulverizar o cortar en fragmentos e introducirlos en el agar.

Las muestras deben incubarse a temperaturas entre 25 y 37 °C. Un método fácil para identificar hongos dimorfos se basa en la temperatura de incubación y consiste en incubar la misma muestra a 25 °C (temperatura a la que crecen los hongos con micelios) y a 37 °C (temperatura a la que crecen las levaduras). Algunos de los hongos que presentan dimorfismo son: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Penicillium marneffeii* y *Sporothrix schenckii*, entre otros²⁰.

Los tiempos de incubación varían en función de la especie: los dermatofitos suelen crecer entre 7 y 28 días, mientras que *Aspergillus* spp., *Scytalidium* spp. y las levaduras, tienen un crecimiento más rápido y pueden identificarse en una semana^{15,21}; sin embargo, siempre se debe esperar un tiempo mínimo de cuatro semanas antes de considerar los cultivos como negativos²².

Al observar la colonia obtenida en el medio de cultivo, es importante evaluar algunas características macroscópicas, como el color (hialino o dematiáceo) y la textura (algodonosa, aterciopelada, granular, cerebrosa, etc.), antes de la visualización microscópica de la muestra, debido a que nos puede orientar hacia el agente etiológico causal²³.

Otra técnica importante en que se usan los medios de cultivo, es la prueba del tubo germinal para la identificación de la especie en el caso de cultivos positivos para levaduras; en esta se siembra la muestra en 0,5 a 1 ml de suero humano o de conejo y se incuba a temperatura de 35 a 37 °C por tres horas. Luego de este tiempo, se observa al microscopio y es positiva si se observan tubos germinales, lo que indica que se trata de *C. albicans* o *C. dubliniensis* (FIGURA 5), y es negativa cuando no se observan tubos germinales, lo que sugiere otras especies de *Candida*²⁴⁻²⁶.

Sin embargo, se han desarrollado medios de cultivo que facilitan la diferenciación de las especies de *Candida*, como lo hacen los medios diferenciales cromogénicos para levaduras; éstos poseen cromógenos que colorean las colonias según la especie (FIGURA 6). El color que toma la colonia varía dependiendo de la casa comercial que fabrique el medio^{4,27,28}.

Cuando se trata de mohos, también se puede identificar la especie por medio de esporulación en microcultivos, método generalmente utilizado para identificar la especie en micosis intermedias. A partir de un cultivo inicial, se hace la siembra en un trozo de agar sobre un portaobjetos y se tapa con un cubreobjetos, en una caja de Petri estéril con cámara húmeda,

sobre el cual va a crecer el hongo. Posteriormente, este cubreobjetos se evalúa por microscopía directa para identificar la especie^{29,30}.

Sin embargo, a pesar de todo lo anterior, el diagnóstico micológico de laboratorio puede ser difícil debido al reducido número de microorganismos presentes en algunas lesiones, el lento crecimiento de algunos de ellos y la dificultad para distinguir la colonización de las superficies mucosas de la infección. Por ello, en los métodos de diagnóstico micológico se están produciendo avances importantes que permiten un diagnóstico más rápido y eficiente, como sucede con las técnicas de biología molecular y la detección serológica de antígenos o de anticuerpos^{31,32}. Algunos de estos métodos ya se están implementando en nuestro medio; sin embargo, no reemplazan los métodos convencionales que tienen gran utilidad y aportan información importante ante la sospecha clínica³³.

Desde 1992, con la publicación de la secuencia completa del cromosoma III de *Saccharomyces cerevisiae*, se inició una serie de avances en el conocimiento del



FIGURA 6. Izquierda: agar con crecimiento de colonias de *Candida* spp. Derecha: medio cromogénico para la identificación de especies de *Candida*, color verde claro para *C. albicans* y morado para *C. parapsilopsis*.

genoma de los hongos³⁴, lo que ha permitido avanzar en el desarrollo de las técnicas moleculares, ya que en ellas el diagnóstico depende de la identificación de fragmentos de ADN o ARN del hongo en fuentes celulares nucleares, extranucleares o ambas^{35,36,37}. En la mayoría de los sistemas de diagnóstico molecular se usa la amplificación de fragmentos genéticos basados en la PCR^{38,39}. La electroforesis en gel de campo pulsante es la técnica estándar de referencia para tipificar la mayoría de microorganismos con importancia clínica, por su ele-

vado poder de discriminación; sin embargo, es difícil de llevar a cabo y su resultado demora más de cuatro días.

Existen otras técnicas moleculares, como la amplificación de genes específicos por PCR^{38,40,41}, la amplificación de secuencias aleatorias, la amplificación de genes *housekeeping* y la amplificación de secuencias repetidas de ADN; sin embargo, por sus altos costos, se utilizan principalmente en estudios de investigación, aunque en nuestro medio ya se han implementado para el diagnóstico de diversas infecciones micóticas⁴².

Entre otros métodos que se han desarrollado en las últimas décadas, encontramos la tecnología de *microarrays* de ADN⁴³, principalmente utilizada para el diagnóstico de micosis profundas por *Aspergillus* spp. y *Candida* spp.⁴⁴. Se basa en el diseño de sondas de captura, a partir de la secuencia de las regiones espaciadoras internas (*Internal Transcribed Spacer*, ITS) de los genes que codifican para el ARN ribosómico⁴⁵. Tiene las ventajas de que actualmente se dispone de iniciadores universales, válidos para cualquier especie fúngica, y que las regiones ITS presentan un grado de variabilidad suficiente como para permitir la distinción de la especie^{36,45,46}.

Finalmente, se ha desarrollado un método de diagnóstico para las micosis invasoras que se basa en la detección serológica de antígenos fúngicos o de la respuesta de anticuerpos que se produce durante la infección⁴⁷. La detección de antígenos fúngicos puede permitir un diagnóstico más temprano de las infecciones fúngicas invasivas^{48,49}, ya que, a diferencia de la detección de la respuesta de anticuerpos, no necesita tiempo de inducción de la respuesta inmunitaria y su detección no se ve influenciada por el estado inmunológico del paciente ni por el inicio del tratamiento. Son técnicas especialmente útiles cuando el microorganismo causal crece lentamente o no crece en los medios de cultivo, como es el caso de infecciones por *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Penicillium marneffeii*, entre otras^{50,51,52}.

Es importante tener en cuenta entonces todas estas herramientas, que son esenciales en el diagnóstico de las infecciones fúngicas, las cuales han asumido un rol cada vez más importante en la práctica clínica diaria; esto se debe, no sólo al incremento en el uso de antibióticos de amplio espectro, sino también al número cada vez mayor de pacientes inmunosuprimidos.

Referencias

1. Quindos GL. Micosis en el amanecer del siglo XXI. Rev Iberoam Micol. 2002;19:1-4.
2. Alexander B. Diagnosis of fungal infection: New technologies for the mycology laboratory. Transpl Infect Dis. 2002;4:32-7.

3. Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses. 2008;51:2-15.
4. Rousselle P, Freydiere A, Couillerot P, de Montclos H, Gille Y. Rapid identification of *Candida albicans* by using Albicans ID and fluoroplate agar plates. J Clin Microbiol. 1994;32:3034-6.
5. Rezusta LA, Sánchez SA, Gil TK. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. Rev Iberoam Micol. 2001;3:1-17.
6. Kaufman L. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. Clin Infect Dis. 1992;15:23-9.
7. Garzón R, Carballo M, Muñoz E, Cipitelli L. La importancia de la preparación del paciente en el examen micológico de laboratorio. Rev Iberoam Micol. 1998;15:307-8.
8. Pemán J, Mazuelos E, Rubio MC. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Rev Iberoam Micol. 2001;4:37-46.
9. Rúgeles MJ, Vásquez JL, Jaramillo E. Etiología y características clínicas de la onicomicosis en un grupo de pacientes inmunosuprimidos. Infectio. 2001;5:7-13.
10. Miranda MF, Silva AJ. New uses of vinyl tape for reliable collection and diagnosis of common superficial mycoses. Skin Med. 2003;2:156-8.
11. Moore MK, Howell SA, Duncan G, Cunningham MJ, Midgley G. A comparison of bright field and fluorescent microscopy in onychomycosis. Rev Iberoam Micol. 2000;17:S131.
12. Gadea I, Cuenca Estrella M. Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;22:32-9.
13. Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las Micosis. Rev Iberoam Micol. 2002;19:25-9.
14. Lilly KK, Koshnick RL, Grill JP, Khalil ZM, Nelson DB, Warshaw EM. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: A repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests. J Am Acad Dermatol. 2006;55:620-6.
15. Rober R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. Mycopathologia. 2008;166:295-306.
16. Monod M, Baudraz Rosselet F, Ramelet AA, Frenk E. Direct mycological examination in dermatology: A comparison of different methods. Dermatologica. 1989;179:183-6.
17. Adelrahman T, LetscherBru V, Waller J, Noacco G, Candolfi E. Dermatophytosis: Comparison of the performance of calcofluor and potassium hydroxide 30% for the direct examination of skin scrapings and nails. J Mycol Med. 2006;16:87-91.
18. Mayayo E. Diagnóstico histopatológico de las micosis. Rev Iberoam Micol. 2004;21:1-9.
19. Brun S, Bouchara JP, Bocquel A, Basile AM, Contet-Audonnet N, Chabasse D. Evaluation of five commercial Sabouraud gentamicin-chloramphenicol agar media. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001;20:718-23.
20. McKinnell JA, Pappas PG. Blastomycosis: New insights into diagnosis, prevention, and treatment. Clin Chest Med. 2009;30:227-39.
21. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev. 1995;8:240-59.
22. Labarca JA, Wagar EA, Grasmick AE, Kokkinos HM, Bruckner DA. Critical evaluation of 4-week incubation for fungal cultures: Is the fourth week useful? J Clin Microbiol. 1998;36:3683-5.
23. Koksall F, Er E, Samasti M. Causative agents of superficial mycoses in Istanbul, Turkey: Retrospective study. Mycopathol. 2009;168:117-23.

24. Campbell CK, Holmes AD, Davey KG, Szekeley A, Warnock DW. Comparison of a new chromogenic agar with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998;17:367-8.
25. Staib P, Morschhäuser J. Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* an enigmatic developmental programme. *Mycoses*. 2007;50:1-12.
26. Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3508-9.
27. Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:3622-7.
28. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González N, Pontón J, et al. Evaluation of the new chromogenic medium Candida ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3340-5.
29. Gomes C, Fidel S, Fidel R, De Moura Sarquis MI. Isolation and taxonomy of filamentous fungi in endodontic infections. *J Endod*. 2010;36:626-9.
30. Wright BE. Endogenous activity and sporulation in slime molds. *Ann NY Acad Sci*. 1963;102:740-54.
31. Blanco JL, García ME. Presente y futuro del diagnóstico inmunológico de las micosis animales. *Rev Iberoam Micol*. 2000;17:S23-8.
32. Mollerach M. Genómica y proteómica: oportunidades y desafíos para la microbiología. *Rev Argent Microbiol*. 2006;38:1-3.
33. Garaizar J, Brena S, Bikandi J, Rementeria A, Pontón J. Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2006;6:987-98.
34. Hofmann G, McIntyre M, Nielsen J. Fungal genomics beyond *Saccharomyces cerevisiae*? *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14:226-31.
35. Hay RJ, Jones RM. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clin Dermatol*. 2010;28:190-6.
36. Álvarez S, García ME, Blanco JL. Diagnóstico micológico: algo está cambiando. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:638-46.
37. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:465-84.
38. Blanz P, Buzina W, Ginter G, Graser Y. Molecular biological methods and their consequences in taxonomy and diagnosis of dermatophytes. *Mycoses*. 2000;43:11-6.
39. Seringhaus M, Paccanaro A, Borneman A, Snyder M, Gerstein M. Predicting essential genes in fungal genomes. *Genome Res*. 2006;16:1126-35.
40. Machouart-Dubach M, Lacroix C, de Chauvin MF, Le Gall I, Giudicelli C, Lorenzo F, et al. Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium* spp. and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism ribotyping method. *J Clin Microbiol*. 2001;39:685-90.
41. Xiang H, Xiong L, Liu X, Tu Z. Rapid simultaneous detection and identification of six species of *Candida* using polymerase chain reaction and reverse line hybridization assay. *J Microbiol Meth*. 2007;69:282-7.
42. Arca E, Saracli MA, Akar A, Yildiran ST, Kurumlu Z, Gur AR. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. *Eur J Dermatol*. 2004;14:52-5.
43. De Backer MD, Ilyina T, Ma XJ, Vandoninck S, Luyten WHML, Vanden Bossche H. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1660-70.
44. Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4943-53.
45. Harmsen D, Schwinn A, Brocker EB, Frosch M. Molecular differentiation of dermatophyte fungi. *Mycoses*. 1999;42:67-70.
46. Doménech-Sánchez A, Vila J. Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:46-54.
47. Manso M, Montillo G, De Sio S, D'Amico G, Discepoli R. Value of antigen and antibody detection in the serological diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13:756-60.
48. Warnock DW, Foot ABM, Johnson EM, Mitchell SB, Cornish JM, Oakhill A. *Aspergillus* antigen latex test for diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet*. 1991;338:1023-4.
49. Stynen D, Meulemans L, Garrigues ML. *Aspergillus* antigen latex test for diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet*. 1992;339:188.
50. Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Rev Iber Micol*. 2007;24:181-6.
51. Ellepola A, Morrison C. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol*. 2005;43:65-84.
52. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*. 2008;166:335-52.
53. Hamilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and *Penicilliosis marneffeii*: Current status and future trends. *Med Mycol*. 1998;36:351-64.