

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico e identificación
de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Clara Isabel Valero Fernández

Directora

María José Buitrago Serna

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico e identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

CLARA ISABEL VALERO FERNÁNDEZ

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología,

Instituto de Salud Carlos III

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico e identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

CLARA ISABEL VALERO FERNÁNDEZ

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología,

Instituto de Salud Carlos III

Madrid, 2017

Directora:

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

Doctoranda:

Clara Isabel Valero Fernández

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a las siguientes ayudas concedidas por el **Instituto de Salud Carlos III** mediante el Fondo de Investigación en Salud (FIS):

- Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) F112/00095 (2012-2016) para el desarrollo del proyecto de investigación, cuyos resultados se recogen en esta tesis.
- Financiación de los proyectos de investigación PI11/00412: “Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico e identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas” (2012-2014) y PI14CIII/00045: “Desarrollo y validación de un método de detección de tipo *point of care* para el diagnóstico diferencial de neumonías fúngicas en pacientes con SIDA” (2015-2017), que han sido esenciales para el desarrollo de esta tesis.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis es el final de un largo camino que me ha permitido crecer tanto profesional como personalmente y que he disfrutado muchísimo. Todo habría sido mucho más difícil y, sobre todo, mucho más aburrido sin el apoyo y el cariño de las personas que me han acompañado durante estos años.

En primerísimo lugar, quería dar las gracias a María José, mi directora de tesis, por confiar en mí desde el primer momento y darme la oportunidad de realizar esta tesis. Gracias por todo el apoyo, los ánimos y el cariño, especialmente, en esta última parte. Gracias, sobre todo, por esa humanidad que derrochas y que te hace única.

No puedo seguir escribiendo sin dar gracias infinitas a mis padres, que son mi ejemplo a seguir y a los que va dedicada esta tesis. Gracias por enseñarme a ser como soy y por vuestro apoyo incondicional durante todos estos años. ¡Os quiero muchísimo!

También a mi hermano Andrés, que es mi auténtica mitad, y a toda mi familia que aunque pequeña, son los más grandes. Gracias por el cariño que siempre me dais.

A Juan, mi compañero y el amor de mi vida. Gracias por compartir conmigo esta aventura y estar ahí tanto en las buenas como en las malas, apoyándome y haciéndome mejor persona todos los días. Nos queda muchísimo por recorrer. ¡Te quiero!

A Emi, por cuidarme tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por los consejos y por ese sentido del humor que le da la vuelta a todo y que siempre consigue sacarme una sonrisa.

A Sara, Rocío, Cris, Ana y Teresa porque, chicas, con vosotras me ha tocado la lotería. Gracias por arroparme y estar ahí en todo momento, os quiero. En particular, quería agradecer a Sara, por enseñarme todo lo que sabe, desde hacer PCRs a cuatro manos hasta a combinar los zapatos con el bolso. ¡Te adoro PCR Queen!

Al equipo: Nuria, Macamoa, Rocío, Olga y Sue. Sois unas campeonas y un referente para cualquiera que trabaje a vuestro lado. Quería agradecer, especialmente, a Nuria, mi hermana de tesis y un gran apoyo en esta etapa final. Algún día nos tocará el Gordo y será por tu bendita culpa.

A Leti y Pepa, gracias por el cariño y la compañía en el cuartel general, sobre todo, en esta última etapa. Sois todo corazón.

A Laura, Ali, Óscar y Araceli. Gracias por vuestro cariño y por estar siempre dispuestos a ayudar. Da gusto aprender a vuestro lado.

A Charo, Susi, Cris, Gema y Ana María, por ser el auténtico motor del laboratorio. Gracias por vuestra inestimable ayuda, sin vosotras las tesis durarían milenios.

A Manolo y Juan Luis que, bien lejos o cerca, siempre han tenido un momento para mis dudas y consultas.

A todos los que han pasado por el laboratorio y a aquellos que han ayudado a sacar trabajo adelante. En especial a Cris Rueda, Ana C, Laura, Lidia, Dani y Gabi.

También quiero dedicar unas líneas a aquellos que me han acogido en sus laboratorios y me han permitido desarrollar parte de este trabajo bajo su tutela:

Me gustaría agradecer al Dr. Julio García Rodríguez toda su ayuda y apoyo para que parte de esta tesis saliera adelante. También a todo el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Paz, especialmente a Flor, Marta y Vero, que me hicieron sentir como en casa durante aquellos dos fabulosos meses.

I would like to say thank you to Dr. Alexandre Alanio and Dr. Stéphane Bretange and also all members of the Laboratory of Parasitology-Mycolology of Saint-Louis Hospital in Paris. It was my pleasure to develop part of this work with you. I will never forget your kindness. Merci beaucoup!

Tampoco quería olvidarme de los que me han ayudado a llegar hasta aquí. Esta tesis no existiría sin Paco y Javi que, desde el Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Murcia, me transmitieron su amor y dedicación por la investigación. Tampoco sin Cecilio, Concha y todo del grupo de Virología Molecular del Centro Nacional de Microbiología, que me dieron toda su confianza y apoyo durante esa etapa puente que es el máster. Seguro que todos veis un pedacito de lo que me enseñasteis aquí.

A Pablo, Periquete, Bruno y Galileo, por hacer de casa un verdadero hogar, por aguantarme y dejarme el mejor sitio siempre que lo he pedido.

A los míos: José, Samay, Marisika, Lorena, Sergio, Antonio, Bran, Kas, Ade, Debo y María, por estar tan cerca aunque nos separen kilómetros y hacer que cada junta sea memorable. Os quiero con locura. ¡Viva el Rural Shore!

A mis biólogos: Luis, Lury, José Miguel, Alba, Marina, Pablo, Saray, Clara, Nino, Jesús, Juanjo y Sonia, que aguantaron los años de carrera a mi lado y que, cerca o lejos, siempre están ahí.

A la Zona Franca, porque sin vuestra locura y cariño las “visiticas” a Murcia no serían lo mismo.

A Fran y Lucía, por hacer todo lo posible por mantenerme siempre a la izquierda.

A Sara, Felipe y Forlán, por hacerme hueco en su isla siempre que lo he necesitado.

Por último, a Raquel, responsable del diseño de la portada de esta tesis y que, junto a Rebeca, Fernán, María, Dani, Víctor, Guti y las chicas de Nokton Magazine (y Adela), ha sido uno de los grandes motivos para adorar Madrid.

ÍNDICE**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS****ÍNDICE DE ACRÓNIMOS INCLUIDOS EN LAS PUBLICACIONES****ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS****RESUMEN****SUMMARY**

1. INTRODUCCIÓN	35
1.1. INCIDENCIA GLOBAL DE LAS ESPECIES FÚNGICAS CAUSANTES DE NEUMONÍAS FÚNGICAS OPORTUNISTAS	36
1.2. PRINCIPALES NEUMONÍAS FÚNGICAS OPORTUNISTAS	39
1.2.1. Neumonías fúngicas asociadas a SIDA	39
1.2.1.1. Criptococosis	39
1.2.1.2. Neumocistosis (PCP)	40
1.2.1.3. Histoplasmosis	41
1.2.2. Neumonías fúngicas asociadas a otro tipo de inmunosupresión	43
1.2.2.1. Aspergilosis invasora (AI)	43
1.2.2.2. Otras neumonías fúngicas	44
1.3. SITUACIÓN ACTUAL DEL DIAGNÓSTICO DE LAS NEUMONÍAS FÚNGICAS OPORTUNISTAS	45
1.3.1. Métodos convencionales y limitaciones	46
1.3.2. Métodos basados en la detección de anticuerpos	48
1.3.3. Métodos basados en la detección de antígenos	48
1.3.4. Métodos basados en la amplificación de ADN: PCR en tiempo real	51
1.4. MÉTODOS ACTUALES DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS CAUSANTES DE NEUMONÍAS OPORTUNISTAS	54
1.4.1. Métodos convencionales de identificación	54
1.4.2. Métodos basados en la amplificación de ADN	55
1.4.3. Métodos basados en el análisis de las curvas de fusión	57
1.4.4. Métodos basados en la espectrometría de masas: EM MALDI-ToF	58

2. OBJETIVOS	63
3. OBJETIVO PRIMERO: DIAGNÓSTICO MOLECULAR PANFÚNGICO	67
4. OBJETIVO SEGUNDO: MEJORA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA NEUMOCISTOSIS.....	85
5. OBJETIVO TERCERO: NUEVOS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE <i>Histoplasma capsulatum</i>	105
6. OBJETIVO CUARTO: ESTUDIO DE LA HISTOPLASMOSIS AFRICANA FUERA DE ZONA ENDÉMICA.....	121
7. DISCUSIÓN.....	137
7.1. NUEVA PCR PANFÚNGICA EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONÍAS OPORTUNISTAS Y OTRAS MICOSIS.....	138
7.2. PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA NEUMOCISTOSIS: UTILIDAD PARA DIFERENCIAR POBLACIONES DE PACIENTES.....	143
7.3. IDENTIFICACIÓN DE <i>Histoplasma capsulatum</i> MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-ToF	148
7.4. ESTUDIO DE LA HISTOPLASMOSIS AFRICANA EN ZONA NO ENDÉMICA E IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIETADES PATÓGENAS DE <i>Histoplasma capsulatum</i>	152
7.5. APLICACIÓN DE LOS RESULTADOS Y PERSPECTIVAS	156
8. CONCLUSIONES.....	161
9. REFERENCIAS	165
10. ANEXOS	
ANEXO I: LISTADO CEBADORES Y SONDAS	
ANEXO II: LISTADO DE CEPAS	
ANEXO III: LISTADO DE NÚMEROS DE ACCESO A GENBANK Y CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIAS DE <i>Histoplasma capsulatum</i>	
ANEXO IV: MATERIAL SUPLEMENTARIO INCLUIDO EN LAS PUBLICACIONES	
ANEXO V: COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES DERIVADAS DEL TRABAJO DE LA TESIS	

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

A			
A	Adenina	CNM	Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, España)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	Cq	Ciclo de amplificación o cuantificación (<i>Cycle of quantification</i>)
ADNm	ADN mitocondrial	CV	Coefficiente de Variación
ADNr	ADN ribosómico	CYTB	Citocromo B (<i>Cytochrome B</i>)
Af	África		
AfSS	África Subsahariana		
AFToL	Ensamblando el Árbol Fúngico de la Vida (<i>Assembling the Fungal Tree of Life</i>)	D	
AHE	Antígeno de Hongos Endémicos	DHPS	Dihidropteroato Sintasa (<i>Dihydropteroate Synthase</i>)
AI	Aspergilosis Invasora	E	
APC	Antígeno Polisacárido Capsular	EAPCRI	<i>European Aspergillus PCR Initiative</i>
ARN	Ácido Ribonucleico	ECIL	Conferencia Europea de Infecciones en Leucemia (<i>European Conference on Infections in Leukaemia</i>)
AS	Cepa Africana (<i>African Strain</i>)	EEUU	Estados Unidos
B		EM	Espectrometría de Masas
BDG	1,3-β-D-glucano	ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
C		EORTC/MSG	Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (<i>European Organization of Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group</i>)
° C	Grado Centígrado/Celsius	F	
C	Citosina	FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
CBS	Centro de Biodiversidad de Hongos (<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrech, Holanda</i>)		
CD4	Cúmulo de Diferenciación 4		
CE	Conformidad Europea (<i>Conformité Européenne</i>)		

Índice de acrónimos

	G				
G	Guanina			LFD	Dispositivo de Flujo Lateral (<i>Lateral Flow Device</i>)
GM	Galactomanano				
	H				M
h	Horas			m/a	Muertes/Año
HCA	Análisis de Agrupamiento Jerárquico (<i>Hierarchical Clustering Analysis</i>)			MALDI-ToF	Desorción/Ionización mediante Láser Asistida por Matriz Acoplada a Analizador de Tiempo de Vuelo (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight</i>)
Hcc	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>			MAT1	Tipo Sexual 1 (<i>Mating Type 1</i>)
Hcd	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>			MIQE	Mínima Información para la Publicación de Experimentos de qPCR (<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>)
HRMA	Análisis de Curvas de Fusión de Alta Resolución (<i>High Resolution Melting Analysis</i>)			MLSA	Análisis Múltiple de Secuencias Variables (<i>Multi-locus Sequence Analysis</i>)
HSP70	Proteína de Choque Térmico 70 (<i>Heat Shock Protein 70</i>)			MLST	Tipificación multilocus de secuencias (<i>Multi-locus Sequence Typing</i>)
	I			µm	Micrómetros o Micras
IF	Inmunofluorescencia			mm³	Milímetros cúbicos
Ig	Inmunoglobulinas o Anticuerpos			mtLSU rRNA	Subunidad Grande del Ribosoma Mitocondrial (<i>Mitochondrial Large Ribosomal Subunit</i>)
IGS	Región Espaciadora Intergénica (<i>Intergenic Spacer</i>)			mtSSU rRNA	Subunidad Pequeña del Ribosoma Mitocondrial (<i>Mitochondrial Small Ribosomal Subunit</i>)
ITS	Región Espaciadora Interna (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)				
	K				N
KOH	Hidróxido Potásico			NAD1	NADH Deshidrogenasa 1 (<i>NADH Dehydrogenase 1</i>)
	L			NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Bethesda, Maryland, EEUU)
Lam	Latinoamérica				
LBA	Lavado Broncoalveolar				
LCR	Líquido Cefalorraquídeo				

NR	N No Recomendado	RPB1	Subunidad Grande de la ARN Polimerasa II (<i>RNA polymerase II Large Subunit</i>)
OLE	O Ácido Graso Desaturasa Delta-9 (<i>Delta-9 Fatty Acid Desaturase</i>)	S	Sensibilidad
OMS	Organización Mundial de la Salud	SDRA	Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda
PCP	P Neumocistosis (<i>Pneumocystis Pneumonia</i>)	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	SNC	Sistema Nervioso Central
PD	Países Desarrollados	SNS	Sistema Nacional de Salud
POC	Punto de Atención al Paciente (<i>Point of Care</i>)	spp.	Varias especies
qPCR	Q PCR Cuantitativa o en Tiempo Real (<i>Quantitative PCR</i>)	T	Timina
R²	R Coeficiente de Determinación	TARVc	Terapia Antirretroviral Combinada
		TNFα	Factor de Necrosis Tumoral Alfa (<i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>)
		TOS	Trasplantados de Órgano Sólido
		VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
		vs.	<i>Versus</i>

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS INCLUIDOS EN LAS PUBLICACIONES

A		CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> (Utrecht, Holanda)
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>	CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CECT	Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España)
AFToL	<i>Assembling the Fungal Tree Of Life (project)</i>	CNM-CM	<i>Fungal Collection of the National Center for Microbiology</i> (Majadahonda, España)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>	CNRMA	<i>Centre National de Référence des Mycoses invasives et antifongiques</i> (París, Francia)
APH	<i>Acute Pulmonary Histoplasmosis</i>	CNV	<i>Copy Number Variation</i>
Arg	<i>Argentina</i>	Col	<i>Colombia</i>
AS	<i>African Strain</i>	CP	<i>Coccidioides posadasii</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Manassas, Virginia, EEUU)	CPH	<i>Cutaneous Primary Histoplasmosis</i>
B		Cq	<i>Cycle of Quantification</i>
BAL	<i>Bronchoalveolar Lavage</i>	CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i>
BAS	<i>Bronchoaspirate or Bronchoalveolar Aspirate</i>	CV	<i>Coefficient of Variation</i>
BHIA	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>	Cy5	<i>Indodicarbocyanine</i>
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i>	CYTB	<i>Cytochrome B</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	D	
bp	<i>Base pair</i>	Da	<i>Dalton</i>
BSL-2/3	<i>Biosafety Level 2/3</i>	DB	<i>Database</i>
C		df	<i>Derivative of Fluorescence</i>
° C	<i>Degrees Centigrade/Celsius</i>	DH	<i>Disseminated Histoplasmosis</i>
C	<i>Cluster</i>	DHPS	<i>Dihydropteroate Synthase</i>
C-	<i>Negative Control</i>	D	
CA	<i>California</i> (EEUU)		

Índice de acrónimos incluidos en las publicaciones

DL	<i>Detection limit</i>	Hcc	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	Hcd	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>
dt	<i>Derivative of Temperature</i>	Hcf	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>farciminosum</i>
E		HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
E	<i>Efficiency</i>	HEX	<i>Hexachlorofluorescein</i>
Ecu	<i>Ecuador</i>	HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
EORTC/MSG	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group</i>	HKY	<i>Hasegawa-Kishino-Yano (model)</i>
Eq Gui	<i>Equatorial Guinea</i>	HP	<i>Histopathology</i>
F		HSP70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
F	<i>Female (sex)</i>	Hz	<i>Hertz</i>
F	<i>Fluorescence</i>	I	
f	<i>Forward (primer)</i>	IC	<i>Immunocompetent</i>
FAM	<i>Carboxyfluorescein</i>	ID	<i>Identification</i>
fg	<i>Femtogram</i>	ID	<i>Immunodiffusion</i>
Fig.	<i>Figure</i>	IF	<i>Immunofluorescence</i>
FL	<i>Fungal load</i>	IFI(s)	<i>Invasive Fungal Infection(s)</i>
FSC-H	<i>Forward Scatter Height</i>	Inc.	<i>Incorporation</i>
G		ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
g	<i>Relative Centrifugal Force</i>	K	
Gha	<i>Ghana</i>	K80	<i>Kimura 2-parameter (model)</i>
Gui-Lib	<i>Guinea-Liberia</i>	kbp	<i>Kilobase pair</i>
H		kV	<i>Kilovolt</i>
H	<i>High (Fungal Load)</i>	L	
h	<i>Hours</i>	L	<i>Low (Fungal Load)</i>
HC/Hc	<i>Histoplasma capsulatum</i>		

	M		
M	<i>Male (sex)</i>	mtSSU	<i>Mitochondrial Small Ribosomal Subunit</i>
M	<i>Mycelium</i>	rRNA	<i>Ribosomal Subunit</i>
M	<i>Medium (Fungal Load)</i>	MUSCLE	<i>Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation</i>
MA	<i>Massachusetts (EEUU)</i>		
MALDI-ToF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight Mass. Spectrometry</i>	n/no	<i>Number</i>
MAT1	<i>Mating Type 1</i>	na	<i>Non-available</i>
MB	<i>Molecular Beacon</i>	NAD1	<i>NADH Dehydrogenase 1</i>
MBP	<i>Molecular Beacon Probe</i>	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, EEUU)</i>
MC	<i>Mucor circinelloides</i>	ND	<i>No Data</i>
MCA	<i>Melting Curve Analysis</i>	ng	<i>Nanogram</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>	Nig	<i>Nigeria</i>
Mex	<i>Mexico</i>	nm	<i>Nanometers</i>
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>	nmol	<i>Nanomol</i>
MgCl₂	<i>Magnesium Chloride</i>	NP	<i>Not performed</i>
min	<i>Minutes</i>	ns	<i>Nanoseconds</i>
ML	<i>Maximum Likelihood</i>		
ml/mL	<i>Milliliter</i>		
µl/µL	<i>Microliter</i>	OLE	<i>Delta-9 Fatty Acid Desaturase</i>
MLSA	<i>Multi-locus Sequence Analysis</i>	OR	<i>Oregon (EEUU)</i>
mm³	<i>Cubic Millimeter</i>		
mM	<i>Millimolar</i>		
µM	<i>Micromolar</i>	PAF	<i>Paraformaldehyde</i>
µm	<i>Micrometre or Micron</i>	Pan	<i>Panama</i>
MSG	<i>Major Surface Glycoprotein</i>	Par	<i>Paraguay</i>
MSP	<i>Main Spectra</i>		
mtDNA	<i>Mitochondrial DNA</i>	PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
mtLSU rRNA	<i>Mitochondrial Large Ribosomal Subunit</i>	PCC	<i>Pneumocystis Carriage</i>
		PCP	<i>Pneumocystis Pneumonia</i>

Índice de acrónimos incluidos en las publicaciones

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	SMC	<i>Standard Melting Curve</i>
Per	<i>Peru</i>	SOT	<i>Solid Organ Transplant</i>
pg	<i>Picogram</i>	sp.	<i>Species</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>	spp.	<i>Several Species</i>
PM	<i>Pyomyositis</i>	SSAf	<i>Sub-Saharan Africa</i>
		syn.	<i>Synonym</i>

Q

q/RT-PCR *Quantitative/Real-Time Polymerase Chain Reaction*

R

r *Reverse (primers)*

r/R² *Coefficient of Determination*

rDNA *Ribosomal DNA*

RNA *Ribonucleic Acid*

RO *Rhizopus oryzae*

ROX *Carboxy-X-Rhodamine*

RPB1 *RNA Polymerase II Large Subunit*

rpm *Revolutions per Minute*

rRNA *Ribosomal RNA*

S

S *Slope (standard curve)*

s *Seconds*

SA *South America*

SAf *South Africa*

SBDA/SDA *Sabouraud Dextrose Agar*

SD *Standard Deviation*

Sen *Senegal*

T

T *Temperature*

**TfEq/
EqTr** *Trophic Form Equivalents*

TIGR MeV *The Institute for Genomic Research (Rockville, Maryland, EEUU)
Multiexperiment Viewer*

Tm *Melting Temperature*

Trn *Tamura-Nei (model)*

U

U *Unit*

Uru *Uruguay*

USA *United States of America*

V

VA *Virginia (EEUU)*

var. *Variety*

Ven *Venezuela*

Y

Y *Yeast*

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.1. Estimación de la incidencia y la mortalidad de las principales micosis que afectan al sistema respiratorio.	36
Tabla 1.2. Características de los métodos de detección de antígeno más utilizados para el diagnóstico de neumonías fúngicas oportunistas.	48

FIGURAS

Figura 1.1. Fase filamentosa y levaduriforme de <i>H. capsulatum</i>	41
Figura 1.2. Visualización directa de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas.	47
Figura 1.3. Organización del ADNr en organismos eucariotas.	56
Figura 1.4. Esquema de la formación de las curvas de fusión tras la amplificación mediante PCR.	58
Figura 1.5. Esquema del proceso de adquisición de espectros mediante la técnica EM MALDI-ToF.	59
Figura 7.1. Alineamiento de secuencias de distintas especies fúngicas que muestra las regiones seleccionadas para el diseño de las sondas <i>molecular beacon</i> en la región ITS1 del ADNr.	140
Figura 7.2. Esquema de los procesos y el tiempo de respuesta asociado de la nueva qPCR panfúngica.	141
Figura 7.3. Curvas de fusión de las especies fúngicas incluidas en la base de datos construida para la identificación a nivel de especie en la nueva qPCR panfúngica.	142
Figura 7.4. Esquema de la organización del ADNm de <i>P. jirovecii</i>	146
Figura 7.5. Geles virtuales y agrupaciones de espectros de los aislados de <i>H. capsulatum</i> incluidos en la base de datos de referencia de perfiles proteicos.	150
Figura 7.6. Preparaciones microscópicas en azul de lactofenol de dos cepas de <i>H. capsulatum</i> a 7, 12 y 20 días de crecimiento incluidas en el proceso de validación de la base de datos de referencia de perfiles proteicos.	151
Figura 7.7. Preparaciones microscópicas en azul de lactofenol de cepas de <i>H. capsulatum</i> en fase levaduriforme que muestran distintos tamaños de células. ...	154

RESUMEN

Las neumonías oportunistas se encuentran entre las infecciones más comunes del paciente inmunodeprimido. Aunque los hongos son la causa de un pequeño porcentaje de estas neumonías, su incidencia ha aumentado significativamente en los últimos años debido al incremento de la población susceptible a la infección fúngica. Este hecho está asociado a la expansión de la epidemia de SIDA y a los avances en el tratamiento de algunas enfermedades comunes.

El diagnóstico microbiológico de las neumonías fúngicas oportunistas es complejo. Los métodos convencionales como el cultivo, la histopatología o la observación directa de las muestras carecen de la sensibilidad y especificidad suficientes. En los últimos años, se han desarrollado técnicas alternativas basadas en la detección de antígenos, anticuerpos y ADN, y más recientemente, en la espectrometría de masas (EM), que complementan a las técnicas clásicas. Sin embargo, muchas de ellas aún requieren de más estudios de validación para garantizar su efectividad.

En este trabajo de tesis se han desarrollado distintos métodos basados en la técnica de la PCR en tiempo real (qPCR), la secuenciación de ADN y la EM para el diagnóstico precoz y la identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas, los cuales se han abordado en cuatro objetivos.

En el primer objetivo, se desarrolló una qPCR panfúngica que combina tres metodologías: i) la detección de ADN fúngico mediante un agente intercalante y cebadores universales, ii) la detección a nivel de género o de grupos de especies fúngicas mediante sondas *molecular beacon* y iii) la identificación a nivel de especie mediante el análisis de curvas de fusión. Los valores de sensibilidad y especificidad globales fueron 83,3% y 100%, respectivamente. Esta técnica evitó la secuenciación del 67,8% de los casos positivos, lo que implica un adelanto considerable del tiempo de respuesta.

En el segundo objetivo, se realizó un estudio basado en la qPCR para definir el número de copias relativo de cuatro genes mitocondriales de *Pneumocystis jirovecii* en muestras respiratorias de pacientes en distintos estadios de la infección. Los resultados demostraron que el número de copias de los cuatro genes es variable de forma individual y también fluctuaba dependiendo de la carga fúngica, siendo menor conforme disminuía

Resumen

la misma, con la excepción del gen *mtSSU rRNA*. Estas variaciones permitieron clasificar a los pacientes en cinco grupos mediante un análisis de agrupamiento jerárquico (HCA). Asimismo, este estudio indica que la qPCR es el método más adecuado para la discriminación entre infección activa y colonización, siendo la diana *mtSSU rRNA* la más adecuada para la cuantificación de *P. jirovecii* en muestras respiratorias humanas debido a su alta sensibilidad y estabilidad.

En el tercer objetivo, se construyó una base de datos de referencia de perfiles proteicos para la identificación, mediante la tecnología EM MALDI-ToF, de *Histoplasma capsulatum* en fase filamentosa y levaduriforme. Todas las cepas de *H. capsulatum* incluidas en el proceso de validación se identificaron correctamente con una especificidad del 100%. El 86,6% de ellas obtuvo una puntuación mayor de 1,7, considerada por el fabricante como correcta para la identificación a nivel de género. El descenso de este punto de corte aumentó la sensibilidad de la técnica sin comprometer su especificidad. Las formas filamentosas se identificaron a los siete días de crecimiento, momento en el que todavía no presentaban los caracteres morfológicos necesarios para su identificación mediante examen microscópico, implicando un adelanto del tiempo de respuesta.

Por último, en el cuarto objetivo, se realizó un estudio retrospectivo sobre la histoplasmosis africana fuera de zona endémica. Para ello, se revisaron 13 casos de pacientes africanos diagnosticados de histoplasmosis probada o posible en el Servicio de Micología, observando que la mayoría de ellos presentaban inmunodeficiencia debida a SIDA y enfermedad diseminada, al contrario de lo tradicionalmente descrito para la histoplasmosis africana. Con el fin de diferenciar las variedades patógenas del hongo, se estudiaron las cepas aisladas a partir de las muestras de dichos pacientes mediante métodos clásicos de identificación, un análisis múltiple de secuencias variables (MLSA) y la determinación del tipo sexual utilizando métodos moleculares. Mientras que los métodos clásicos de identificación no permitieron diferenciar las dos variedades, los métodos moleculares posibilitaron la agrupación de todas las cepas africanas de ambas variedades, evidenciando su relación genética y sugiriendo que la clasificación tradicional del hongo debe ser revisada. Finalmente, se observó una distribución desigual del tipo sexual en las cepas africanas. Los resultados de este trabajo evidencian la imposibilidad de diferenciar las dos variedades de *H. capsulatum* presentes en el continente africano, así como la

necesidad de más estudios para conocer la epidemiología y las características de la infección.

Los trabajos incluidos en esta tesis doctoral contribuirán a la mejora del diagnóstico precoz y la identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas y, por tanto, al adelanto del establecimiento de una terapia antifúngica eficaz que permitirá la reducción de la morbilidad y mortalidad de este tipo de infecciones.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF NEW DIAGNOSTIC AND IDENTIFICATION METHODS OF OPPORTUNISTIC PNEUMONIA-CAUSING FUNGAL SPECIES

INTRODUCTION

Pneumonia is one of the most common infections in immunosuppressed patients. Among the vast diversity of respiratory pathogens, fungi account for only a small portion of agents causing opportunistic pneumonias. However, fungal infections have risen in last years because of the increasing size of population at risk, mainly due to:

1. The worldwide spread of HIV infection, especially in low income countries, which had led to the emergence of life-threatening fungal infections like cryptococcosis, pneumocystosis (PCP) and endemic mycoses (histoplasmosis and coccidioidomycosis).

2. The increasing use of immunosuppressive medication for treating serious medical conditions, which have favored opportunistic fungal infections like aspergillosis, mucormycosis and other mycoses caused by uncommon fungal species.

Laboratory diagnosis of opportunistic fungal pneumonias is difficult. Classical methods such as culture, histopathology and direct examination lack for enough sensitivity and specificity. To overcome weaknesses in the diagnosis of fungal infections, alternative approaches based on the detection of antigens, antibodies and DNA have been developed and they are now used as complementary diagnostic tools. However, due to lack of a proper standardization, the utility of some of these techniques is not recognized in the international guidelines for the management of patients with fungal disease and more studies are needed.

Due to antifungal susceptibility pattern varies between fungal species, pathogen identification needs to be performed. Classical methods based on microscopic examination are slow and need for skilled personnel, whereas molecular methods are also time consuming, require a proper sequence database for comparison and are only available in certain laboratories. In the last decade matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry mass spectrometry (MALDI-ToF

MS) has emerged as a suitable alternative for microbial identification. However, few studies have been performed with uncommon species like BSL-3 fungal pathogens.

OBJECTIVES

Due to the need of fast, reliable and sensitive diagnostic and identification methods, we have addressed the following specific objectives in this thesis:

1. To develop and validate a new panfungal real-time PCR (qPCR) assay for the early diagnosis of opportunistic fungal pneumonia and other fungal infections.
2. To improve the molecular diagnosis of PCP by quantifying four mitochondrial genes of *Pneumocystis jirovecii*.
3. To develop a MALDI-ToF MS reference database for the identification of *Histoplasma capsulatum*.
4. To study African histoplasmosis in a non-endemic area scenario and evaluate different identification methods to distinguish *H. capsulatum* pathogenic varieties.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Development and validation of a new panfungal qPCR assay for the early diagnosis of opportunistic fungal pneumonias and other fungal infections.

Panfungal qPCR assays are very useful when there is not a clear suspicion of the fungus involved in the IFI. However, PCR products need to be sequenced for pathogen identification, which drives to a delay in the response time and removes benefits of early diagnosis.

We have developed a new panfungal qPCR assay which combines: (i) panfungal detection by using a binding dye, (ii) specific detection of fungal genera or groups causing opportunistic pneumonias by using molecular beacon probes and (iii) species identification by using melting curve analysis. The technique was standardized and validated by using 11 different fungal species and 60 clinical samples from patients with proven and probable fungal infection. A database was also constructed by collecting those melting curves obtained from fungal species included in the standardization assay. The

overall sensitivity and specificity of the technique was 83,3% and 100%, respectively, and sequencing was avoided in 67,8% of positive cases.

The technique is an open system as new probes could be designed depending on the needs of the laboratories and new melting curves could be added to the constructed database. Moreover, this new assay allows reducing response time from 120 to 24 hours in comparison with the current panfungal qPCR assay established in our laboratory.

2. Quantification of mitochondrial targets of *P. jirovecii* by using qPCR.

Molecular diagnosis of PCP is often based on the detection of *mtLSU rRNA* mitochondrial gene but the number of copies of mitochondrial genes regarding nuclear genome had not been investigated yet.

We have optimized six qPCR assays to determine the copy number of four mitochondrial genes (*mtSSU rRNA*, *mtLSU rRNA*, *NAD1* and *CYTB*) in comparison to nuclear genome (*DHPS* and *HSP70*). Eighty-four bronchoalveolar fluids of patients at different stages of the infection were evaluated. Our results suggest that copy number of mitochondrial genes varied from gene to gene and also according to *P. jirovecii* physiological state with a decreased number of copies when the fungal load is low, with the exception of *mtSSU rRNA* target. Moreover, neither immunofluorescence results nor final clinical diagnosis reflected fungal load properly in clinical samples.

These results reveal an unexpected variability of *P. jirovecii* mtDNA copy number that fluctuates according to the physiological state of the fungus that could be explained if various subspecies of mtDNA with different amplification rates coexist at the same time. Moreover, we suggest that *mtSSU rRNA* gene could be the best target to detect *P. jirovecii* in human respiratory samples due to its great sensitivity and copy number stability.

3. Development of a MALDI-ToF MS reference database for *H. capsulatum* identification.

The isolation of *H. capsulatum* from cultures is time-consuming, requires biosafety level 3 containment, experienced personnel, and usually calls for an additional confirmation test.

A MALDI-ToF MS reference database has been constructed and validated with 63 fungal strains in a blind assay. All *H. capsulatum* strains (n=30) were correctly identified by

Summary

the database with 100% of specificity and 86,6% had scores above 1,7. When decreasing this cut-off, sensitivity rose without affecting specificity. This method allowed an earliest identification of *H. capsulatum* strains when compared with classical methods. This was due to mycelial isolates included in the validation panel had seven days of growth and did not present characteristic tuberculate macroconidia impairing microscopic examination.

We have developed the first reference database for the identification of *H. capsulatum* using MALDI-ToF MS technology that includes both morphological stages of the fungus which also allows for reducing response time and decreasing risk in fungus manipulation.

4. Recognition and identification of *H. capsulatum* pathogenic varieties in a non-endemic area scenario.

The differentiation within *H. capsulatum* varieties is a challenge as studies describing clinical presentation, microbiological characteristics and fungi identification are outdated and limited by small sample sizes. This is especially difficult in non-endemic areas where the disease might be misdiagnosed.

We have reviewed 13 cases of African patients with histoplasmosis. Strains isolated from these patients were studied by assessing classical identification methods (urease test and yeast size determination by using flow-cytometry) and molecular techniques (three-loci multi-locus sequence analysis (MLSA) and mating type identification). Historical statements about the infection and classical identification methods were useless to distinguish between varieties, whereas molecular analyses revealed that all strains with African origin grouped together, indicating their genetic relationship and suggesting that traditional classification of the fungus in three varieties should be revised. Finally, mating type was unequally distributed in African strains.

Although the number of African strains included in the study is low, this is the first time that strains isolated from African patients with histoplasmosis have been analyzed using different molecular approaches. However, further investigation on African histoplasmosis is required to unravel established classical concepts about the infection.

CONCLUSIONS

1. The new panfungal qPCR is fast, sensitive, and specific and avoids amplicon sequencing in many instances shortening response time.

2. *Pneumocystis jirovecii* DNAm shows an unexpected variability that fluctuates according to the physiological state of the fungus.

3. The quantification of *P. jirovecii* fungal load by qPCR would be the most objective criteria for further analysis because it prevents any bias due to technical or clinical interpretation, being *mtSSU rRNA* gene the best target to detect *P. jirovecii* in human samples.

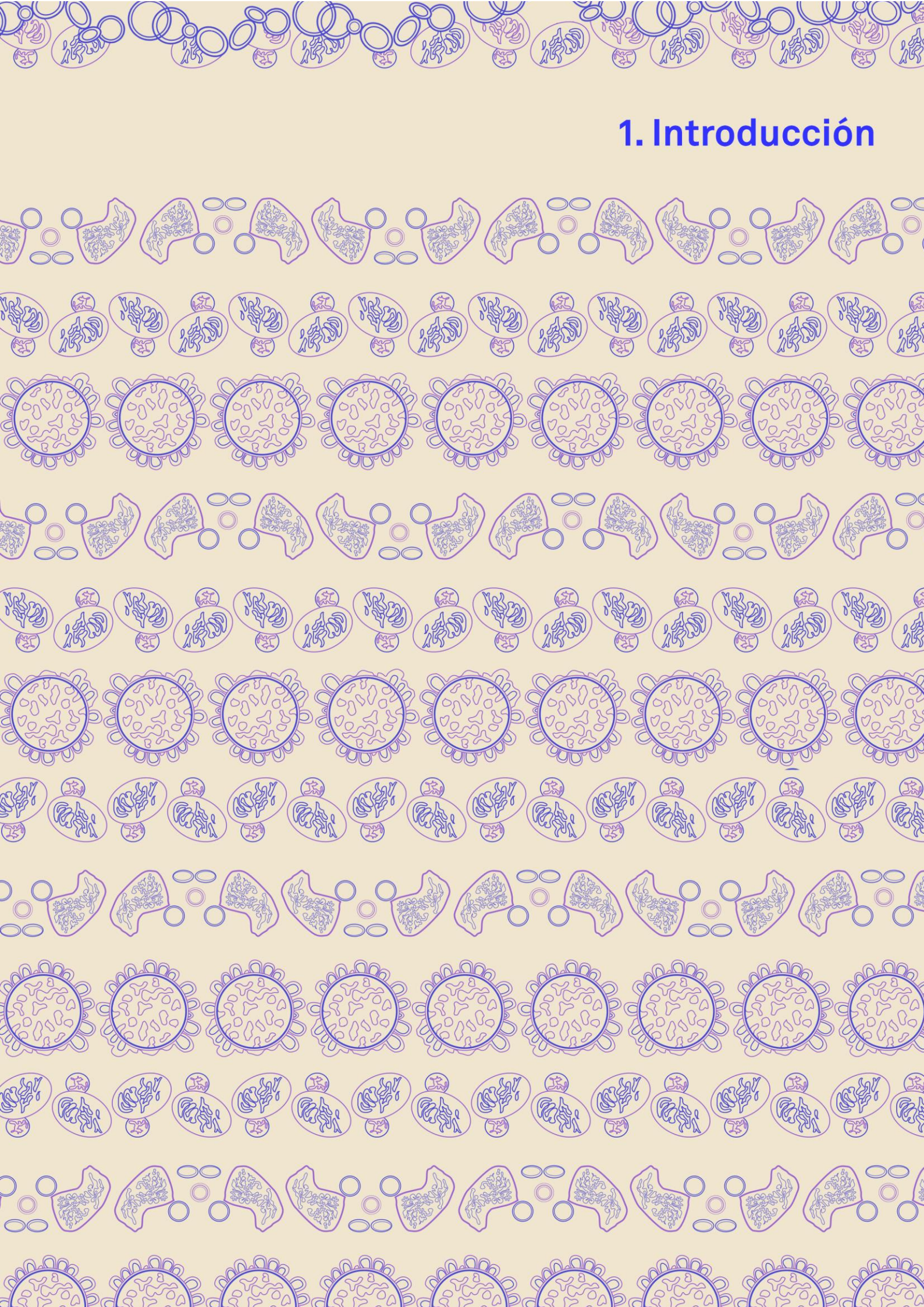
4. The MALDI-ToF MS reference database constructed was able to identify both morphological phases of *H. capsulatum* and allows for reducing response time and decreasing risk in fungus manipulation.

5. Traditional concepts about African histoplasmosis and classical identification methods did not allow for distinguishing *H. capsulatum* varieties in our clinical setting.

6. Molecular analyses revealed that all *H. capsulatum* strains with African origin grouped together suggesting that traditional classification should be revised.

7. The implementation of findings achieved in this work will contribute to the improvement of early diagnosis and identification of opportunistic pneumonia-causing fungal species, allowing the establishment of a prompt antifungal therapy and consequently reducing morbidity and mortality rates of these infections.

1. Introducción



La neumonía es la primera causa de muerte por enfermedad infecciosa en los países desarrollados (Restrepo MI *et al.*, 2014) y la principal causa de muerte infantil en todo el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2016). Las infecciones pulmonares o neumonías oportunistas, en el paciente inmunodeprimido, se encuentran entre las enfermedades más frecuentes debido a la exposición continua del sistema respiratorio al ambiente (Letourneau AR *et al.*, 2014). Se ha descrito que el 70% de las personas infectadas por el VIH y el 60% de los pacientes neutropénicos padecen, al menos, una complicación pulmonar durante el curso de la enfermedad (Gingo MR *et al.*, 2013; Vento S *et al.*, 2008). El tipo y grado de inmunosupresión determina el perfil de los patógenos potenciales abarcando una gran variedad de microorganismos (José RJ y Brown JS, 2012). Aunque los hongos son tan solo responsables de un pequeño porcentaje de estas infecciones, su incidencia ha aumentado en los últimos años debido a dos factores principales:

i) La epidemia global de SIDA, que ha propiciado la aparición de infecciones fúngicas oportunistas, las cuales causan una elevada mortalidad, principalmente en países en vías de desarrollo de África, Asia y América Central y del Sur.

ii) Los avances médicos para ciertas enfermedades comunes, que han permitido el desarrollo de tratamientos efectivos (tratamientos con inmunosupresores, terapias con corticoides, trasplantes de células hematopoyéticas y órgano sólido, etc.) y, sin embargo, han favorecido el aumento de infecciones fúngicas oportunistas (Jerez-Puebla LE, 2012).

El diagnóstico y la identificación de las especies causantes de neumonías fúngicas oportunistas son complejos. Los métodos de diagnóstico tradicionales, considerados aún como los métodos de referencia, son lentos y presentan baja sensibilidad (Lass-Flörl C y Mayr A, 2009). En los últimos años se han desarrollado técnicas basadas en la detección de antígenos, anticuerpos y ADN, y más recientemente, en la espectrometría de masas (EM) basada en la técnica MALDI-ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*). Algunas técnicas se han comercializado, pero otras se encuentran aún bajo evaluación clínica y requieren de más estudios de validación que aseguren su efectividad y permitan su utilización en la práctica clínica de rutina (Arvanitis M *et al.*, 2014).

El objetivo de esta tesis es el desarrollo y la validación de nuevos métodos para el diagnóstico y la identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas, con la finalidad de anticipar su diagnóstico e implantar una terapia antifúngica eficaz.

1.1. INCIDENCIA GLOBAL DE LAS ESPECIES FÚNGICAS CAUSANTES DE NEUMONÍAS FÚNGICAS OPORTUNISTAS

Las infecciones fúngicas no son enfermedades de declaración obligatoria por lo que se desconoce su incidencia global, con la excepción de la histoplasmosis y la coccidioidomicosis en zonas endémicas de EEUU (CDC, 2016a; CDC, 2016b). En su defecto, existen estimaciones de la incidencia y mortalidad de las principales micosis oportunistas que afectan al sistema respiratorio, las cuales se han reflejado en la **Tabla 1.1**. Si analizamos los datos por regiones se observan notables diferencias entre los países en vías de desarrollo, marcados por la influencia de la epidemia de SIDA, y los países desarrollados, donde la epidemia está más controlada.

Tabla 1.1. Estimación de la incidencia y la mortalidad de las principales micosis que afectan al sistema respiratorio. Modificada de (Brown GD et al., 2012).

Micosis	Organismo (especie mayoritaria)	Distribución	Incidencia (casos/año)	Mortalidad
Criptococosis*	<i>Cryptococcus</i> spp. (<i>C. neoformans</i>)	Global	1 000 000 PD: 8 300 AfSS: 720 000 Lam: 54 400	650 000 m/a EEUU: 15-20%; 700 m/a AfSS: 55-70%; 504 000 m/a Lam: 55-70%; 29 900 m/a
PCP*	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Global	400 000 PD: 108 000 Af: 143 000	20-80% SIDA ^a : 10-30% No SIDA ^a : 40-70%
Histoplasmosis*	<i>Histoplasma capsulatum</i>	EEUU, Lam, Af	EEUU/AfSS: 300 000 ^b Lam: 24 000 ^c	28-50% EEUU/AfSS: 10 000 ^b Lam: 9 600 m/a ^c
AI	<i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. fumigatus</i>)	Global	200 000	30-95%
Coccidioidomicosis*	<i>Coccidioides</i> spp.	EEUU y Lam	EEUU: 25 000 Lam: 0,3-40% ^d	1-70%
Mucormicosis	Mucorales (<i>Rhizopus arrhizus</i>)	Global	10 000	30-90%

AI: Aspergilosis Invasora; **PCP:** Neumocistosis; **EEUU:** Estados Unidos; **Lam:** Latinoamérica; **Af:** África; **PD:** Países desarrollados; **AfSS:** África Subsahariana; **m/a:** muertes/año.

*Micosis marcadoras de SIDA (todas ellas en su forma diseminada o extrapulmonar, excepto PCP) (Schneider E et al., 2008).

^aDatos extraídos de (Skalski JH et al., 2015).

^bDatos extraídos de (Armstrong-James D et al., 2014).

^cDatos extraídos de (Neglected Histoplasmosis in Latin America Group, 2016).

^dDatos extraídos de (Colombo AL et al., 2011) (basados en pruebas de reactividad cutánea).

La infección por el VIH sigue siendo uno de los principales factores de riesgo para la adquisición de una infección fúngica oportunista y, aunque el establecimiento de la terapia antirretroviral combinada (TARVc) ha modificado la deriva de la epidemia, aún es un problema de primer orden en los países con menos recursos (Armstrong-James D *et al.*, 2014). Los datos del año 2015 reflejan que el 75,4% de las nuevas infecciones por el VIH se dieron en África Subsahariana donde, además, las tasas de prevalencia y mortalidad asociadas a SIDA son las mayores del planeta (GBD HIV Collaborators, 2016). Asia y el océano Pacífico son la segunda región con mayor número de personas infectadas por el VIH en el mundo, siendo China, India e Indonesia los países que acaparan las tres cuartas partes del total de la población seropositiva de la zona (UNAIDS, 2016). En otras áreas desfavorecidas como América Latina la prevalencia del VIH es relativamente baja, aunque Brasil, Colombia, Méjico y Venezuela acumulan el 75% de los casos (UNAIDS, 2014).

Las infecciones fúngicas más prevalentes en los pacientes con SIDA son la criptococosis, la neumocistosis o PCP (*Pneumocystis Pneumonia*) y algunas micosis endémicas como la histoplasmosis y la coccidioidomicosis (**Tabla 1.1**). Tras la implantación de la TARVc, la incidencia de algunas de estas infecciones cambió radicalmente en aquellos países donde se instauró la terapia.

En EEUU y Europa Occidental la criptococosis, que alcanzaba el 10% en pacientes con SIDA, disminuyó drásticamente, aunque ha seguido causando gran morbilidad y mortalidad en países con acceso limitado a la terapia, llegando hasta 500 000 muertes al año en África Subsahariana (Mazuelos EM y Garcia AI, 2010; Park BJ *et al.*, 2009).

La PCP es una de las enfermedades definitorias de SIDA más común en países desarrollados, con 2-3 casos por cada 100 pacientes infectados por el VIH al año (Kaplan JE *et al.*, 2009). Aunque esta micosis respiratoria se ha considerado rara en países de rentas bajas y medias, sobre todo en zonas tropicales, recientemente se ha sugerido que esta baja prevalencia podría deberse al limitado acceso a las herramientas diagnósticas adecuadas y, por tanto, su frecuencia real sería mucho más alta (de Armas Rodríguez Y *et al.*, 2011; Lowe DM *et al.*, 2013).

La incidencia de la histoplasmosis y la coccidioidomicosis también ha disminuido tras la implantación de la TARVc en los países desarrollados, pero la mortalidad de estas micosis endémicas es todavía alta (Baddley JW *et al.*, 2008; Masannat FY y Ampel NM, 2010). En concreto, la histoplasmosis diseminada es la enfermedad definitoria de SIDA

más frecuente y la mayor causa de mortalidad en pacientes VIH positivos en América Latina en la actualidad, describiéndose alrededor de 1 500 casos al año en zonas especialmente prevalentes como la cuenca del Amazonas (Adenis AA *et al.*, 2014; Nacher M *et al.*, 2013). Autores de estas regiones han propuesto que sea declarada enfermedad olvidada debido al gran número de casos descritos y a la ausencia de un diagnóstico eficiente (Neglected Histoplasmosis in Latin America Group, 2016).

En los pacientes con inmunosupresión distinta a SIDA, las infecciones fúngicas prevalentes son diferentes. La aspergilosis invasora (AI) representa la mayor causa de infección invasora fúngica pulmonar, con una incidencia anual del 1,6-3% en pacientes con cáncer, principalmente en aquellos con neoplasias hematológicas y trasplantados de médula ósea (Gregg KS y Kauffman CA, 2015). La PCP también se ha convertido en una enfermedad oportunista muy importante en este tipo de pacientes, especialmente cuando la profilaxis no es adecuada (Cordonnier C *et al.*, 2016). Por último, otros hongos raros y/o emergentes son la causa de un mayor número de infecciones fúngicas oportunistas no asociadas a SIDA en los últimos años. Muchos de ellos son resistentes a los antifúngicos y, por tanto, están asociados a un mal pronóstico (Park BJ *et al.*, 2011). La mucormicosis es una de las micosis respiratorias emergentes más importantes, siendo los pacientes con neoplasias hematológicas, los trasplantados de médula ósea y los pacientes con diabetes *mellitus* los más afectados (Petrikos G *et al.*, 2012).

En España, alrededor de 180 000 personas están infectadas por el VIH (0,4% de la población general) (Plan Nacional sobre el SIDA, 2016). Aunque la TARVc está ampliamente extendida, la PCP ha sido la enfermedad definitoria de SIDA más común en los últimos cinco años con una incidencia de 3,4 casos por cada 100 000 habitantes al año (Área de Vigilancia de VIH y Comportamientos de Riesgo, 2016; Rodríguez-Tudela JL *et al.*, 2015). En pacientes con otro tipo de inmunosupresión, existen estimaciones respecto a la incidencia de la AI con 2,75 casos por cada 100 000 habitantes al año (Rodríguez-Tudela JL *et al.*, 2015). En cuanto a las micosis importadas, España es uno de los países con más casos descritos fuera de zona endémica. La histoplasmosis es la infección más habitual con 128 casos comunicados en las últimas tres décadas, mayoritariamente en inmigrantes con SIDA como enfermedad de base y viajeros procedentes de las regiones endémicas (Buitrago MJ y Cuenca-Estrella M, 2012).

1.2. PRINCIPALES NEUMONÍAS FÚNGICAS OPORTUNISTAS

Las especies fúngicas que causan neumonías en el paciente inmunodeprimido comparten la vía de entrada en el organismo, ya que estas infecciones se adquieren por inhalación de las partículas infectivas presentes en el ambiente y, por ello, la clínica primaria se manifiesta en el sistema respiratorio. Además, la inmunosupresión de base que presentan estos pacientes proporciona al hongo la oportunidad para diseminarse desde los pulmones al resto del organismo.

A continuación se describen las principales características de las neumonías fúngicas oportunistas más importantes, en función del tipo de inmunosupresión que presenta el paciente en el que cursan.

1.2.1. Neumonías fúngicas asociadas al SIDA

A pesar de que la tasa de implantación de la TARVc no deja de aumentar, las muertes debidas a infecciones fúngicas en los pacientes con SIDA alcanzan el 50% en todo el mundo. Actualmente, la principal causa de la mortalidad por infección fúngica en los pacientes VIH positivos es la meningitis criptocócica, seguida de la PCP. Además, el curso de la epidemia de SIDA ha propiciado el surgimiento de infecciones causadas por otras especies fúngicas como los hongos endémicos (Armstrong-James D *et al.*, 2014).

1.2.1.1. Criptococosis

La criptococosis es una importante infección fúngica oportunista causada por levaduras encapsuladas del género *Cryptococcus*. Las especies que causan la infección en humanos son, principalmente, *C. neoformans* y *C. gattii* (Maziarz EK y Perfect JR, 2016).

La infección por el VIH es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la criptococosis, de ahí el profundo impacto que la epidemia de SIDA ha tenido en la epidemiología de la infección (Antinori S, 2013).

Aunque la enfermedad provoca una gran variedad de manifestaciones clínicas, la meningitis criptocócica es la más importante. Esta presentación cursa con dolor de cabeza,

fiebre, neuropatía craneal, letargia, pérdida de memoria e irritación meníngea. Está considerada como enfermedad definitoria de SIDA, especialmente cuando el recuento de linfocitos CD4 cae por debajo de 100 células/mm^3 (Maziarz EK y Perfect JR, 2016). La criptococosis pulmonar es la segunda presentación clínica más común, pues se ha descrito que un 10-55% de los pacientes VIH positivos con meningitis criptocócica también presentan clínica pulmonar (Brizendine KD *et al.*, 2011). Sin embargo, pese a que la inhalación de las esporas es la ruta de adquisición de la infección, la forma respiratoria está infradiagnosticada (Chang CC *et al.*, 2015). Esta infección pulmonar cursa con fiebre, tos seca y disnea, que puede progresar a síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) (Smith JA y Kauffman CA, 2012).

1.2.1.2. Neumocistosis (PCP)

Pneumocystis jirovecii es el agente causal de la PCP y durante muchos años ha sido considerado como un protozoo hasta que se reclasificó como un hongo mediante el análisis molecular del ARN ribosomal (Edman JC *et al.*, 1988). Este hongo es un patógeno específico del ser humano y se transmite de persona a persona (Yiannakis EP y Boswell TC, 2016). La exposición al hongo es muy común en niños menores de 2 años en los que se han detectado anticuerpos anti-*P. jirovecii* (Respaldiza N *et al.*, 2004; Vargas SL *et al.*, 2001). *Pneumocystis jirovecii* no crece en los medios de cultivo artificiales habitualmente utilizados en los laboratorios de microbiología, lo que hace muy difícil el estudio de su diversidad genética, evolución y complejidad (Cissé OH *et al.*, 2012).

La infección asintomática o colonización, caracterizada por una baja carga del patógeno y la ausencia de clínica respiratoria, es común en los pacientes inmunodeprimidos (Morris A y Norris KA, 2012). Esta colonización, no solo es importante debido a que contribuye a la transmisión de la infección, sino que también predispone a los pacientes a un alto riesgo de desarrollar la PCP (Tasaka S y Tokuda H, 2014). Además, puede activar la respuesta inflamatoria causando daño pulmonar y empeorar otras enfermedades respiratorias concomitantes (Morris A *et al.*, 2008). El principal factor de riesgo para el desarrollo de la PCP es un recuento de linfocitos CD4 menor de 200 células/mm^3 debido a la infección por el VIH o a tratamientos inmunosupresores.

También son importantes otros factores como la neutropenia prolongada, la alteración en la actividad de los macrófagos o la inhibición del TNF α (Carmona EM y Limper AH, 2011).

La presentación clínica de la PCP no es distinta a la de otros procesos pulmonares, ya que cursa con fiebre, insuficiencia respiratoria y tos no productiva. Mientras que esta presentación es indolente en pacientes con SIDA, debido a que no pueden desarrollar una respuesta inflamatoria eficiente (Siegel M *et al.*, 2016), los pacientes con otro tipo de inmunosupresión suelen presentar síntomas más severos y el progreso de la infección puede ser fulminante (Roux A *et al.*, 2014; Rey A *et al.*, 2015).

1.2.1.3. Histoplasmosis

La histoplasmosis está causada por el hongo dimórfico *H. capsulatum* (Figura 1.1), endémico de determinadas regiones del continente americano y África. Se han descrito dos variedades que causan infección en humanos: *H. capsulatum* var. *capsulatum* y *H. capsulatum* var. *duboisii*. Esta última es exclusiva del continente africano, donde las dos variedades coexisten (Bahr NC *et al.*, 2015).

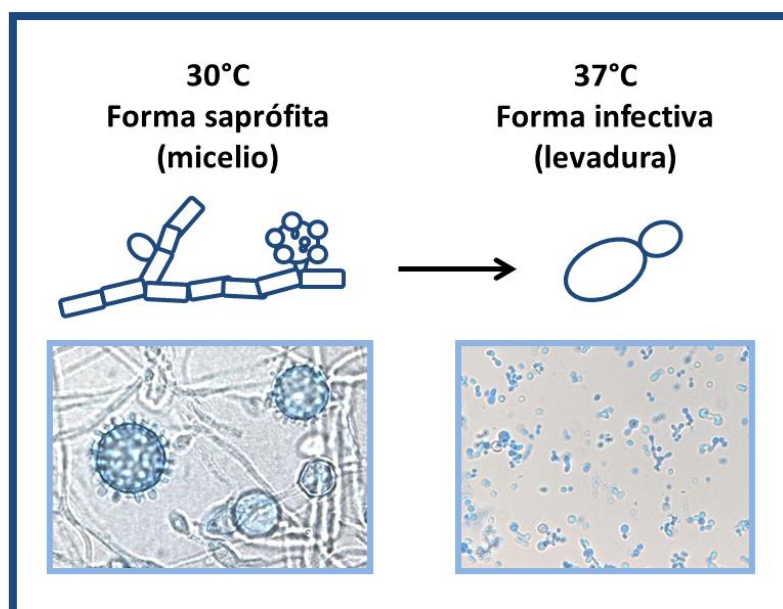


Figura 1.1. Fase filamentosa y levaduriforme de *H. capsulatum*. El hongo está presente en su forma filamentosa en la naturaleza (30 °C), la cual se caracteriza por presentar microconidios y unos característicos macroconidios tuberculados. Este hongo se convierte en levadura al infectar los tejidos del hospedador (37 °C) (Kauffman CA, 2007).

La infección se adquiere por inhalación de los conidios presentes en suelos ricos en materia orgánica, con alta proporción de deposiciones de murciélagos o pájaros, o mediante la reactivación de una infección latente adquirida años atrás (Kauffman CA, 2011; Knox KS y Hage CA, 2010).

La clínica primaria de la histoplasmosis difiere dependiendo de la variedad implicada en la infección. Mientras que *H. capsulatum* var. *capsulatum* causa clínica pulmonar, se ha descrito que *H. capsulatum* var. *duboisii* afecta, principalmente, a la piel y el tejido subcutáneo (Gugnani HC, 2000). Esta infección primaria, principalmente estudiada en *H. capsulatum* var. *capsulatum*, es asintomática y autolimitada hasta en un 90% de los casos. Sin embargo, en el 10% restante puede darse una infección más o menos grave dependiendo de determinados factores como el tamaño del inóculo, la virulencia de la cepa, la edad y el estado inmunitario del paciente (Wheat LJ *et al.*, 2016). La inmunosupresión es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de una enfermedad grave, así como para la diseminación del patógeno. La infección tiende a diseminarse, especialmente, en pacientes VIH positivos con recuento de linfocitos CD4 menor de 200 células/mm³ (Huber F *et al.*, 2008). El cuadro clínico de esta forma diseminada incluye fiebre, fatiga, malestar general, pérdida de peso, síntomas respiratorios y, en ocasiones, lesiones cutáneas (Wheat LJ *et al.*, 2016).

En el caso de la variedad africana (*H. capsulatum* var. *duboisii*), la infección se ha descrito, tradicionalmente, como poco común en pacientes con SIDA debido a que, probablemente, se encuentra infradiagnosticada en aquellas regiones de África Subsahariana donde es endémica (Antinori S *et al.*, 2006). De hecho, a día de hoy, la prevalencia, patogenicidad, epidemiología y mortalidad de la infección causada por esta variedad del hongo siguen siendo desconocidas.

Los síntomas más comunes de la histoplasmosis pulmonar son fiebre, escalofríos, disnea y tos, lo que la hace indistinguible de otras neumonías de origen vírico o bacteriano (Hage CA *et al.*, 2012). Además, estas manifestaciones pueden ir acompañadas de otras complicaciones (nódulos, granulomas, lesiones fibróticas y necróticas, etc.) que, aunque suelen ser asintomáticas, pueden confundirse con neoplasias o nódulos tumorales (Wheat LJ *et al.*, 2016).

1.2.2. Neumonías fúngicas asociadas a otro tipo de inmunosupresión

Como se ha mencionado anteriormente, las infecciones fúngicas en los pacientes inmunodeprimidos no dejan de aumentar en los países desarrollados. Esto está relacionado con el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades graves como las neoplasias hematológicas, el cáncer de órgano sólido y las enfermedades autoinmunes (Limper AH, 2010). La AI es una de las infecciones más frecuentes en este tipo de pacientes pero, cuando un enfermo presenta varios factores predisponentes y durante un periodo de tiempo prolongado, casi cualquier especie fúngica puede causar una infección. Además, al aumentar el número de enfermos con factores de riesgo, se ha incrementado la probabilidad de que especies fúngicas menos frecuentes, raras o poco conocidas puedan causar una infección (Badiie P y Hashemizadeh Z, 2014).

1.2.2.1. Aspergilosis invasora (AI)

La AI es la infección invasora por hongo filamentoso más común en humanos. Existen más de 250 especies de *Aspergillus* siendo *A. fumigatus* la más aislada, seguida de *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger* (Patterson TF *et al.*, 2000). Estos hongos son ubicuos en la naturaleza y la infección se adquiere por la inhalación de los conidios presentes en el ambiente (Gregg KS y Kauffman CA, 2015).

La neutropenia profunda (recuento de neutrófilos menor de 100 células/mm³) y prolongada (más de 14 días) es el principal factor de riesgo para desarrollar AI e incluye aquellos pacientes sometidos a trasplante de células hematopoyéticas, con leucemia o síndromes mielodisplásicos. En los últimos años también se han identificado otros grupos de pacientes con alto riesgo como los trasplantados de órgano sólido (TOS), especialmente los de pulmón con una incidencia del 4-23,3% (Fortún J *et al.*, 2012).

Aunque el diagnóstico y el tratamiento de la AI han mejorado durante los últimos años, las tasas de mortalidad siguen siendo altas. La aparición de especies resistentes a los antifúngicos azólicos, primera línea de tratamiento de la AI, plantea serios inconvenientes debido a las pocas opciones que existen para tratar las infecciones resistentes. Además, el aumento de la incidencia de las especies crípticas, aquellas difíciles de diferenciar morfológicamente, se ha convertido también en un problema debido a que algunas

también presentan susceptibilidad reducida a los antifúngicos (Alastruey-Izquierdo A, 2013; Cadena J *et al.*, 2016).

Los síntomas más comunes de la AI son tos, fiebre, dolor en el pecho, disnea y expectoraciones sanguíneas a causa de la invasión de los vasos sanguíneos por las hifas del hongo. Los pacientes neutropénicos pueden no presentar fiebre y otros síntomas, debido a la imposibilidad de estos pacientes de generar una respuesta inflamatoria eficaz. Sin embargo, la invasión del sistema vascular puede ser más predominante en ellos (Thompson GR, 3rd y Patterson TF, 2011), lo cual está directamente relacionado con la diseminación de la infección a otros órganos como la piel, el cerebro o los ojos (Kosmidis C y Denning DW, 2015).

1.2.2.2. Otras neumonías fúngicas

Las infecciones por hongos y levaduras emergentes o poco comunes han aumentado en los últimos años a causa del continuo aumento de la población susceptible, al mejor reconocimiento de estas infecciones, debido a los avances diagnósticos, y a la presión selectiva provocada por la terapia antifúngica, ya que muchas de estas especies presentan una sensibilidad reducida a los fármacos utilizados habitualmente en la práctica clínica (Chen SC *et al.*, 2011).

La mucormicosis es una de las micosis emergentes más importantes y se define como la infección causada por los hongos pertenecientes al orden Mucorales. Aproximadamente, el 65% de los casos están causados por especies de los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, seguidos de otras especies como: *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces elegans*, *Saksenaea vasiformis* o *Lichtheimia corymbifera* (Farmakiotis D y Kontoyiannis DP, 2016). La mayoría de estas especies tienen una respuesta muy limitada a los tratamientos antifúngicos (Alastruey-Izquierdo A *et al.*, 2009). La presentación clínica, muy similar a la de la AI, tiende a progresar muy rápidamente con una prominente invasión vascular, pudiendo afectar estructuras adyacentes al pulmón como el parénquima pleural, el pericardio o el mediastino (Smith JA y Kauffman CA, 2012).

Entre las especies menos comunes de hongos también destacan los géneros *Fusarium* y *Scedosporium*, que producen infecciones asociadas a una alta mortalidad en los pacientes inmunodeprimidos. Solo algunas especies de *Fusarium* causan infecciones en

humanos, entre ellas, las pertenecientes a los complejos *F. solani*, *F. dimerum* y *F. oxysporum* son las más comunes (Guarro J, 2013). Las especies clínicas más relevantes de *Scedosporium* son *Lomentospora prolificans* (antiguamente *S. prolificans*) y *S. apiospermum*, que realmente es un complejo formado por seis especies: *S. apiospermum sensu stricto*, *S. boydii* (antiguamente *Pseudallescheria boydii*), *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *S. minutisporum* y *S. desertorum* (Lackner M et al., 2014). La presentación clínica también es muy parecida a la producida por *Aspergillus* spp. y sus hifas pueden confundirse fácilmente con este género cuando se observan en cortes de tejido.

Existe, además de estas especies, un número cada vez más amplio de hongos y levaduras causantes de neumonías fúngicas oportunistas. El cuadro clínico varía desde la colonización de las vías respiratorias hasta la invasión local del pulmón o la diseminación de la infección al resto del organismo. Como ejemplos se pueden citar los siguientes géneros: *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Bipolaris*, *Ochroconis*, *Cladophialophora*, *Wangiella*, *Curvularia*, *Exophiala*, *Alternaria*, *Phialophora*, *Fonsecaea* y *Ulocladium* (Chen SC et al., 2011).

1.3. SITUACIÓN ACTUAL DEL DIAGNÓSTICO DE LAS NEUMONÍAS FÚNGICAS OPORTUNISTAS

Se ha demostrado que el diagnóstico temprano de las infecciones fúngicas mejora el pronóstico del paciente, ya que permite el establecimiento de una terapia antifúngica eficaz (Ostrosky-Zeichner L, 2012). Sin embargo, el diagnóstico de las neumonías fúngicas oportunistas es complejo debido a la inespecificidad de los síntomas clínicos, que impide distinguirlos de otro tipo de neumonías. Además, las limitaciones de los métodos de diagnóstico hace necesario basarse en la combinación de factores clínicos, radiológicos y microbiológicos para alcanzar el diagnóstico definitivo (Lamoth F y Alexander BD, 2014). Por ello, el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas es esencial y algunos de los nuevos métodos ya se utilizan de forma complementaria a los métodos convencionales. A continuación se describen los métodos más usados actualmente para el diagnóstico de las infecciones fúngicas, destacando las aplicaciones más útiles para la detección de especies causantes de neumonías fúngicas oportunistas.

1.3.1. Métodos convencionales y limitaciones

El cultivo, la observación de muestras en fresco y la histopatología siguen siendo los métodos de referencia para el diagnóstico de las infecciones fúngicas.

Pese al uso de medios de cultivo especializados y, aunque el procesamiento de las muestras sea correcto, los hongos son difíciles de cultivar. Algunos de ellos, como los causantes de micosis endémicas, presentan un desarrollo lento, requieren de niveles de contención de tipo III, debido a su condición de patógenos primarios, y en muchos casos ni siquiera se consigue crecimiento (Buitrago MJ y Cuenca-Estrella M, 2012). Además, los hongos son contaminantes habituales del laboratorio y están presentes en la flora normal del ser humano, por lo que pueden dar lugar a falsos positivos (Cuenca-Estrella M *et al.*, 2011). La sensibilidad del cultivo depende también de la muestra clínica de origen. Como ejemplo, *Aspergillus* crece en cultivo a partir de lavados broncoalveolares (LBA) en el 45-62% de los pacientes con AI y en el 8-34% a partir de muestras de esputo, pero raramente se consigue crecimiento a partir de muestras de sangre o suero. Por otro lado, menos del 25% de los pacientes con mucormicosis presentan cultivos positivos a partir de muestras respiratorias (Lass-Flörl C y Mayr A, 2009). Por último, también influye la clínica del paciente, siendo más rentables aquellos cultivos procedentes de infecciones diseminadas que los derivados de pacientes con presentaciones pulmonares o con una clínica más limitada. Por ejemplo, mientras que el 74% de los pacientes con histoplasmosis diseminada presentan cultivos positivos, la sensibilidad disminuye a un 42-67% en los pacientes con clínica pulmonar (Hage CA *et al.*, 2015). Por otra parte, en la fusariosis diseminada, la sensibilidad del hemocultivo aumenta del 40 al 60% en presencia de lesiones cutáneas, las cuales indican una enfermedad más avanzada (Lass-Flörl C y Mayr A, 2009).

La visualización directa de las muestras, tras una tinción adecuada, también puede ser útil para la detección de ciertos hongos (**Figura 1.2**). Las tinciones que emplean reactivos como el hidróxido de potasio (KOH) al 10-20%, el colorante fluorescente calcolflúor o el azul de lactofenol son las más comunes. En general, la sensibilidad de estas técnicas es baja y, en muchas ocasiones, solo permiten identificar características generales de la morfología de los hongos (forma levaduriforme o filamentosa) (Lease ED y Alexander BD, 2011). Sin embargo, a pesar de las limitaciones de la técnica, es el método diagnóstico

de referencia de la PCP, al no existir un sistema de cultivo eficiente. El método más utilizado actualmente para la detección de *P. jirovecii* en muestras respiratorias es la tinción de la inmunofluorescencia (IF), cuya sensibilidad es del 50-98% en pacientes con SIDA, aunque disminuye en pacientes en tratamiento y con otro tipo de inmunosupresión (Tasaka S y Tokuda H, 2013). La tinción negativa con tinta china es útil para el diagnóstico de la criptococosis, así como las tinciones de Wright, Giemsa o plata metenamina de Grocott para el diagnóstico de la histoplasmosis (Brandt ME *et al.*, 2011), aunque su rentabilidad disminuye en infecciones localizadas o en pacientes inmunocompetentes.

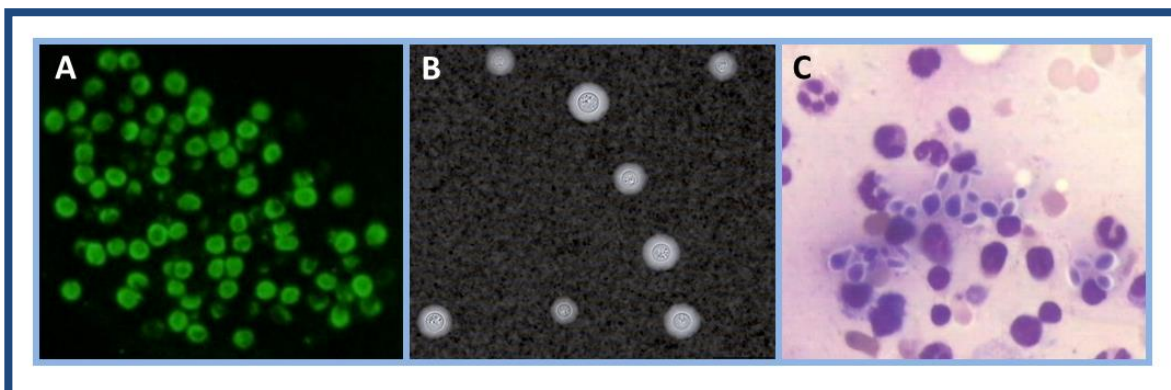


Figura 1.2. Visualización directa de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas. A) Tinción de la IF en muestra respiratoria donde se observan las formas quísticas de *P. jirovecii* (Imagen cedida por el Dr. Alexandre Alanio). B) Células de *C. neoformans* suspendidas en tinta china, en las que la cápsula se observa como un halo blanco alrededor de la célula (Imagen cedida por la Dra. Nuria Trevijano Contador). C) Tinción de Giemsa en muestra de médula ósea donde se observan levaduras de *H. capsulatum* rodeadas por un halo claro (Chandra H *et al.*, 2012).

La histopatología, basada en la identificación visual de estructuras fúngicas en muestras de tejido, es complicada y requiere de personal cualificado. Este método está limitado por el tamaño de la muestra y por la imposibilidad de diferenciar la especie implicada en la infección, debido a que la presencia de elementos fúngicos comunes como hifas o levaduras no proporciona la información suficiente para distinguirlas (Lease ED y Alexander BD, 2011). Además, la obtención de biopsias del tejido afectado es un procedimiento muy invasivo y puede estar contraindicado en determinados pacientes (Perfect JR, 2013). Por último, la técnica de preservación del tejido excluye la posibilidad de obtener el organismo en cultivo (Lease ED y Alexander BD, 2011).

1.3.2. Métodos basados en la detección de anticuerpos

La detección de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) ha sido utilizada ampliamente para el diagnóstico de micosis endémicas e incluye distintas técnicas como la fijación del complemento y los ensayos inmunoenzimáticos o de inmunodifusión en agar. Sin embargo, en el paciente inmunodeprimido, la sensibilidad de estas técnicas disminuye debido a los defectos del sistema inmune (Lease ED y Alexander BD, 2011). Además, la interpretación de los resultados es complicada, ya que la seroconversión se produce semanas después de la infección primaria y las Ig se detectan hasta dos años después de la misma, por lo que un resultado positivo no indica necesariamente infección, lo cual es muy común en la población residente en zonas endémicas (Hsu JL *et al.*, 2011).

1.3.3. Métodos basados en la detección de antígenos

La detección de antígenos ha supuesto una revolución en el diagnóstico temprano de las micosis oportunistas. En la **Tabla 1.2** se describen las principales características de estas técnicas, la sensibilidad de cada una de ellas y sus limitaciones.

Tabla 1.2. Características de los métodos de detección de antígeno más utilizados para el diagnóstico de neumonías fúngicas oportunistas.

Antígeno	Organismo	S (suero)	S (LBA)	Limitaciones
BDG	Parcialmente panfúngico	AI 50-80% PCP 95-96%	NR	-No discrimina entre especies -Falsos positivos -BDG inexistente en <i>Cryptococcus</i> spp. y Mucorales -Sistema comercial cerrado -Bajo rendimiento en pacientes TOS (66%)
GM	<i>Aspergillus</i> spp.	71-78%	>70%	-Falsos positivos (reactividad cruzada con otros hongos, antibióticos) -Falsos negativos (terapia antifúngica) -Bajo rendimiento en pacientes TOS (23%)
APC	<i>Cryptococcus</i> spp.	90% (LCR) 70% (suero)	NR	-Reactividad cruzada con otros hongos -Bajo rendimiento en formas pulmonares (25-56%)
AHE	<i>H. capsulatum</i> (A) <i>C. immitis</i> (B)	90% ^a (A) 84% ^a (B) 93% (LCR) (B)	94% (A)	-Reactividad cruzada con otros hongos -En suero y orina, bajo rendimiento en formas pulmonares (30-83% (A))

S: Sensibilidad; **LBA**: Lavado Broncoalveolar; **BDG**: 1,3-β-D-Glucano; **GM**: Galactomanano; **APC**: Antígeno Polisacárido Capsular; **AHE**: Antígeno de Hongos Endémicos; **AI**: Aspergilosis invasora; **PCP**: Neumocistosis; **NR**: No Recomendado; **TOS**: Trasplantados de Órgano Sólido.

^aSensibilidad de la detección en suero y orina.

Estas técnicas están incluidas en los criterios de diagnóstico propuestos por el Grupo de Estudio de Micosis de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC/MSG, *European Organization of Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group*) (De Pauw B *et al.*, 2008). Los métodos más empleados para el diagnóstico de las neumonías oportunistas se basan en la detección del biomarcador panfúngico 1,3- β -D-glucano (BDG), del galactomanano (GM) en la AI, del antígeno polisacárido capsular (APC) en la criptococosis y del antígeno de hongos endémicos (AHE) en la histoplasmosis y la coccidioidomicosis.

El BDG es un componente de la pared de los hongos, excepto *Cryptococcus* spp. y Mucorales, que se libera durante la infección y su detección en suero es útil para el diagnóstico de la AI y la PCP (Ambasta A *et al.*, 2015; Karageorgopoulos DE *et al.*, 2013), aunque su utilidad disminuye en los pacientes trasplantados de órgano sólido (TOS) (Lu Y *et al.*, 2011a). Sin embargo, son varios los factores que hacen que esta técnica sea cada vez menos utilizada: i) la imposibilidad de diferenciar entre especies, ii) el elevado número de falsos positivos y iii) su presentación en un formato comercial cerrado que, en ocasiones, implica el envío de las muestras a un centro de referencia (Cuenca-Estrella M *et al.*, 2011; Perfect JR, 2013).

La detección del GM, un polisacárido de la pared celular de *Aspergillus* spp., presenta una sensibilidad variable en función del tipo de paciente y su enfermedad de base (Ambasta A *et al.*, 2015). Se ha descrito que esta técnica muestra mayor rendimiento en pacientes con neoplasias hematológicas y trasplantados de médula ósea, pero la sensibilidad disminuye sustancialmente en pacientes trasplantados de órgano sólido (Pfeiffer CD *et al.*, 2006). Se recomienda realizar determinaciones seriadas en suero dos veces a la semana, ya que algunos estudios indican que esta estrategia puede mejorar el diagnóstico precoz de la AI (Bernal-Martínez L *et al.*, 2016). Factores como la reactividad cruzada con otros hongos, el uso de antibióticos (causa de falsos positivos) y el tratamiento con antifúngicos (causa de falsos negativos) influyen en los resultados afectando a la especificidad y sensibilidad de la técnica (Lease ED y Alexander BD, 2011).

La aglutinación en látex es la técnica más utilizada para la detección del APC de *Cryptococcus* spp. La sensibilidad de esta técnica es variable dependiendo del tipo de muestra (líquido ceforraquídeo (LCR) o suero) y de la presentación clínica de la enfermedad. La técnica presenta un buen rendimiento en los pacientes con meningitis

criptocócica, especialmente en aquellos con SIDA, siendo menor su sensibilidad en los pacientes con clínica pulmonar localizada (Baddley JW y Dismukes WE, 2011).

La detección de AHE representa un gran avance en el diagnóstico de las micosis endémicas. El antígeno de *H. capsulatum* puede detectarse tanto en suero como en orina en la infección diseminada, pero la sensibilidad de la técnica es mucho menor cuando la enfermedad está localizada en los pulmones (Hage CA *et al.*, 2015). En el caso de la coccidioidomicosis la detección de antígeno se puede realizar, además, en LCR. Esto supone una gran ventaja para el diagnóstico de la enfermedad diseminada con afectación del sistema nervioso central (SNC), aunque la sensibilidad también disminuye en presentaciones menos graves o localizadas en el sistema respiratorio (Kassis C *et al.*, 2015). Estos ensayos están limitados por el alto grado de reactividad cruzada con otros organismos, por lo que, a menudo, requieren de pruebas adicionales para confirmar el diagnóstico (Malcolm TR y Chin-Hong PV, 2013).

También se ha evaluado la detección de antígenos en otras muestras como los LBA debido a la baja sensibilidad de la detección en las presentaciones pulmonares de algunas micosis (Hage CA *et al.*, 2011). Los valores de sensibilidad de la detección del GM y del AHE de *H. capsulatum* son aceptables en este tipo de muestras y permiten adelantar el diagnóstico (Ambasta A *et al.*, 2015; Hage CA *et al.*, 2011), mientras que la detección del BDG y del APC no está recomendada debido a la baja reproducibilidad y al bajo valor predictivo positivo descritos para estas muestras (Kralovic SM y Rhodes JC, 1998; Shi XY *et al.*, 2016).

Recientemente, se han desarrollado nuevas tecnologías basadas en la incorporación de ensayos inmuno-cromatográficos en dispositivos de flujo lateral (LFD, *Lateral Flow Device*) para la detección de *Cryptococcus* spp. y *Aspergillus* spp. Estos métodos tienen la ventaja de ser rápidos, sensibles y de bajo coste, y no necesitan entrenamiento específico para su manejo ni equipamiento adicional (Prattes J *et al.*, 2016). El LFD de *Cryptococcus* spp. está basado en la detección de la misma molécula que la técnica de la aglutinación en látex y presenta datos de sensibilidad incluso superiores a esta (alrededor del 100%) (Nalintya E *et al.*, 2016). Por el contrario, el LFD de *Aspergillus* spp. se basa en la detección de un antígeno extracelular distinto al GM, lo que reduce la reactividad cruzada de la técnica, aunque los valores de sensibilidad y especificidad son comparables a los de la detección del GM (Mikulska M *et al.*, 2015).

Actualmente, se encuentra en desarrollo un método similar para el diagnóstico de la histoplasmosis (Falci DR *et al.*, 2016).

1.3.4. Métodos basados en la amplificación de ADN: PCR en tiempo real

Los métodos moleculares basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) han pasado a ocupar un lugar privilegiado en la rutina diagnóstica de los laboratorios clínicos ya que ofrecen una identificación rápida, sensible y específica de los microorganismos. Independientemente de la metodología utilizada, estos métodos tienen la capacidad de reducir el tiempo de obtención de resultados y proporcionan un diagnóstico preciso (Buchan BW y Ledebor NA, 2014). Los sistemas basados en PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR, *quantitative PCR*) permiten medir la cantidad de ADN presente en la muestra y establecer la carga fúngica en el paciente, son más rápidos y específicos que las técnicas convencionales y permiten la visualización en tiempo real de los resultados (Arvanitis M *et al.*, 2014). Aunque se trata de técnicas muy prometedoras, también presentan limitaciones. La qPCR puede dar lugar a falsos positivos debido a contaminaciones, especialmente en muestras no estériles como las respiratorias y, en menor medida, en muestras de suero y sangre. Estas últimas, aunque son muestras menos invasivas para el paciente, suelen presentar una carga fúngica baja, con lo que la sensibilidad de la técnica disminuye (Alanio A y Bretagne S, 2017; Khot PD y Fredricks DN, 2009). Estas limitaciones, junto a la falta de estandarización y la ausencia de sistemas comerciales ampliamente evaluados, hacen que estas técnicas no se hayan incluido en los criterios de diagnóstico propuestos por el grupo consenso de la EORTC/MSG (De Pauw B *et al.*, 2008).

Existen tres aproximaciones para el diagnóstico de las infecciones fúngicas mediante qPCR: i) detección específica, ii) detección múltiple y iii) detección panfúngica o de amplio rango.

En cuanto a la qPCR específica, los mayores esfuerzos para la estandarización y validación se han centrado en las especies causantes de la AI y la PCP. Un estudio reciente destaca que la qPCR, para el diagnóstico de la AI, presenta valores de sensibilidad y especificidad de 76,8-88% y 75-94,5%, respectivamente. Estos valores son muy parecidos a los que presentaban las técnicas de detección del GM y del BDG cuando fueron incluidas

en los criterios diagnósticos de la EORTC/GSM (White PL *et al.*, 2015). El estudio mencionado es el resultado de iniciativas como la EAPCRI (*European Aspergillus PCR Initiative*) que tiene como finalidad establecer una metodología de consenso, para el uso de la PCR de *Aspergillus* spp., y permitir su inclusión en los criterios diagnósticos de la AI (<http://eapcri.eu/>).

Respecto al diagnóstico de la PCP, la utilidad de la qPCR específica está respaldada por varios estudios que muestran valores de sensibilidad y especificidad de 97-99% y 90-94%, respectivamente (Fan LC *et al.*, 2013; Lu Y *et al.*, 2011b; Summah H *et al.*, 2013). El comité científico de la Conferencia Europea de Infecciones en Leucemia (ECIL, *European Conference on Infections in Leukaemia*) ha incluido recientemente la qPCR en sus directrices para el diagnóstico de la PCP debido a su mayor rentabilidad, respecto a la técnica de la IF en LBA (Alanio A *et al.*, 2016b). El mayor reto del diagnóstico molecular de la PCP es la discriminación entre infección activa y colonización. La qPCR podría servir para establecer un punto de corte que permita diferenciar las poblaciones de pacientes. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados hasta la fecha, no se ha establecido un valor de consenso que permita esta diferenciación sin sacrificar la sensibilidad o la especificidad del ensayo (Alanio A *et al.*, 2016b). Debido al interés en el desarrollo de herramientas diagnósticas para estas micosis respiratorias, algunas técnicas se han comercializado. Por ejemplo, se han desarrollado formatos como *MycAssay* (*Microgen Bioproducts*, Reino Unido), *MycoReal* (*Ingenetix*, Viena) y *Genius* (*PathoNostics*, Holanda) para la detección de *P. jirovecii* y *Aspergillus* spp. con valores de sensibilidad y especificidad variables. Todos han recibido el marcaje CE (*Conformité Européenne*), necesario para ser distribuidos por Europa, pero ninguno ha recibido la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos estadounidense (FDA, *Food and Drug Administration*). Además, se requiere de más estudios y comparaciones entre los distintos productos para acreditar su verdadera utilidad (Moser SA y Wicker J, 2016; Vila Estapé J *et al.*, 2016).

En comparación con el alto número de estudios de qPCR disponibles para el diagnóstico de la AI y la PCP, en el resto de neumonías fúngicas los datos son, todavía, limitados. Entre otros, se han desarrollado varios protocolos para la detección de *H. capsulatum* (Buitrago MJ *et al.*, 2006; Simon S *et al.*, 2010) e incluso se ha realizado un estudio multicéntrico donde se respalda la idoneidad de la qPCR frente a la PCR

convencional (Buitrago MJ *et al.*, 2013b). También se han desarrollado ensayos puntuales dedicados a la detección de especies del orden Mucorales (Millon L *et al.*, 2013), al diagnóstico de la criptococosis (Veron V *et al.*, 2009) y de la coccidioidomicosis (Gago S *et al.*, 2014a). Pese a estos esfuerzos, no existen métodos comercializados y se requiere de estandarizaciones y validaciones más amplias para poder establecer estos métodos como parte de la rutina diagnóstica.

Actualmente una de las aproximaciones con mayor proyección es la qPCR en formato múltiple. Estos ensayos permiten la detección de distintos patógenos en el mismo experimento, siendo muy útiles para el diagnóstico diferencial de especies que causan el mismo cuadro clínico y para la detección de infecciones mixtas. Un ejemplo es la qPCR múltiple desarrollada en el Servicio de Micología para el diagnóstico de neumonías fúngicas oportunistas en pacientes VIH positivos. Esta técnica permite la detección simultánea de *H. capsulatum*, *P. jirovecii* y *Cryptococcus* spp. con alto valor de sensibilidad (90,7%) en muestras clínicas (Gago S *et al.*, 2014b). Además de este ensayo, se han descrito otros dirigidos a la detección de *Aspergillus* spp. (Alonso M *et al.*, 2012) y Mucorales (Bernal-Martínez L *et al.*, 2013) que permiten la identificación de especies del mismo género o grupo con distinto perfil de susceptibilidad a los antifúngicos.

La utilidad de los desarrollos mencionados anteriormente está limitada a la sospecha de una infección por un género o especie de hongo concreta. Por ello, cuando esta sospecha no es evidente, la denominada PCR panfúngica adquiere suma importancia. Esta técnica se basa en el uso de cebadores universales que amplifican regiones conservadas en diferentes hongos. El método de identificación posterior es más complejo e incluye distintas técnicas: hibridación *Southern*, chips de ADN o *microarrays*, análisis de curvas de fusión, ionización por electroespray y secuenciación del fragmento amplificado, que suele ser la técnica más utilizada (Powers-Fletcher MV y Hanson KE, 2016). Aunque se han desarrollado numerosos protocolos para la utilización de este tipo de PCR, existen pocos formatos en tiempo real y la sensibilidad de estas técnicas, en muestras de biopsias parafinadas, se encuentra entre el 86-94% para casos con cultivo positivo y el 64-89% en casos confirmados mediante histopatología (Buitrago MJ *et al.*, 2013a; Lau A *et al.*, 2007; Muñoz-Cadavid C *et al.*, 2010). El retraso en el tiempo de respuesta debido a la necesidad de identificar la especie detectada, la predisposición que presentan estas técnicas para la contaminación por otros hongos presentes en la flora normal del ser humano y la

dificultad para obtener biopsias en algunos tipos de pacientes constituyen las mayores limitaciones de esta técnica (Khot PD y Fredricks DN, 2009).

1.4. MÉTODOS ACTUALES DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS CAUSANTES DE NEUMONÍAS OPORTUNISTAS

La identificación de los hongos causantes de infecciones fúngicas es de gran importancia, ya que pueden existir diferencias en el perfil de susceptibilidad de las distintas especies a los antifúngicos y, en consecuencia, en la respuesta de los pacientes al tratamiento y en el pronóstico de la infección (Albataineh MT *et al.*, 2016). Cuando se obtiene un hongo a partir de un cultivo, la identificación mediante los métodos convencionales puede ser difícil y, en ocasiones, no concluyente siendo necesario recurrir a los métodos moleculares. Las importantes limitaciones que presentan los métodos clásicos de identificación plantean la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que permitan mayor rapidez en la identificación y amplíen el rango de especies identificables de una forma fiable (Unda F *et al.*, 2011). En este aspecto, las técnicas basadas en la amplificación de ADN, el análisis de curvas de fusión y la EM MALDI-ToF se postulan como una excelente alternativa frente a los métodos convencionales.

A continuación se detallan los métodos de identificación de especies fúngicas más utilizados en la actualidad priorizando aquellas aplicaciones que permiten la identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas.

1.4.1. Métodos convencionales de identificación

Los métodos convencionales de identificación se basan en el estudio de las características morfológicas macro- y microscópicas del microorganismo y en métodos bioquímicos. El estudio de la morfología de los hongos requiere de personal muy especializado, ya que presenta un alto grado de dificultad, sobre todo cuando se trata de especies cercanas con características fenotípicas similares. La fiabilidad de la identificación depende, en gran medida, de la experiencia del observador y tiene un componente subjetivo. Además, en aquellos casos donde la identificación a nivel de especie sea

posible, se requieren días o semanas para obtener el cultivo en la fase óptima para su observación, en especial cuando se trata de los hongos filamentosos (Unda F *et al.*, 2011). En cuanto a los criterios metabólicos y enzimáticos, aunque son muy utilizados en el caso de las levaduras, son de escasa utilidad en la identificación de hongos filamentosos y dimórficos.

En el caso de los hongos endémicos, la demostración de ambas fases morfológicas (filamentosa y levaduriforme) ha sido considerada como el método de referencia, pero ya no se requiere por ser un proceso lento y requerir de instalaciones de contención de tipo III (Ayats J *et al.*, 2011). Por último, existe un método para la detección de *H. capsulatum* y *C. immitis* en cultivo basado en la utilización de sondas de ADN quimioluminiscentes *AccuProbe* (Gen-Probe, EEUU). Este método presenta buenos valores de sensibilidad y especificidad, pero se trata de una técnica muy compleja y lenta (Gómez BL, 2014).

Actualmente, estos métodos se utilizan en combinación con nuevos métodos más rápidos y sensibles.

1.4.2. Métodos basados en la amplificación de ADN

La amplificación, secuenciación y posterior análisis de las regiones de ADN ribosomal (ADNr) es el método más útil para la identificación de especies fúngicas. Esta técnica presenta numerosas ventajas: i) elevada sensibilidad, ya que las subunidades ribosomales de los organismos eucariotas están organizadas en repeticiones de hasta 70 veces, lo que favorece la detección mediante PCR; ii) permite el diseño de cebadores universales, ya que las zonas de interés están flanqueadas por genes ribosomales conservados (18S, 5.8S y 28S) que posibilitan la amplificación de, virtualmente, cualquier hongo (**Figura 1.3**), y iii) las regiones de interés presentan una variabilidad suficiente como para diferenciar a nivel de especie (Kozel TR y Wickes B, 2014).

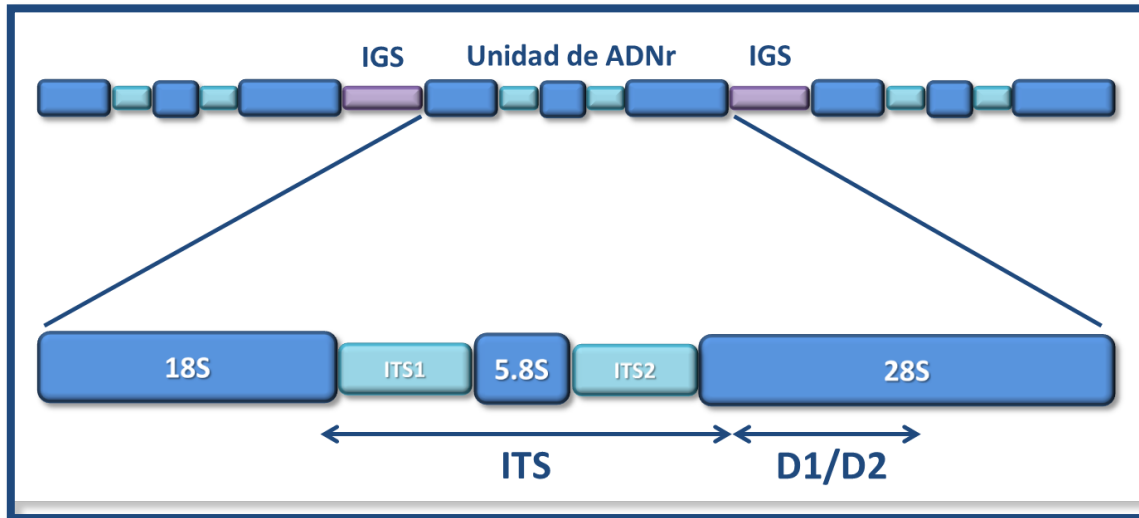


Figura 1.3. Organización del ADNr en organismos eucariotas. Las subunidades ribosomales están organizadas en repeticiones del ADNr 18S, la región ITS1, el ADNr 5.8S, la región ITS2 y el ADNr 28S. A su vez, estas repeticiones se encuentran localizadas entre las regiones IGS.

Las dianas moleculares más utilizadas son la región espaciadora interna 1 (ITS1, *Internal Transcribed Spacer*) y 2 (ITS2), pero también otras como la región D1/D2, situada en la subunidad 28S del ADNr (Kozel TR y Wickes B, 2014) y las regiones espaciadoras intergénicas (IGS, *Intergenic Spacer*), las cuales son muy útiles para diferenciar especies de *Cryptococcus* spp. (Diaz MR *et al.*, 2005). Sin embargo, la especificidad de estas regiones no es suficiente para la identificación de algunos hongos, siendo necesario el desarrollo de métodos basados en dianas moleculares alternativas (Petti CA *et al.*, 2008).

Independientemente de la diana utilizada, la precisión de la identificación va a depender, en gran medida, de la base de datos con la que se compare la secuencia obtenida del fragmento amplificado (Irinzi L *et al.*, 2015). Existen distintas bases de datos libres, algunas amplias como *GenBank* del Centro Nacional de Información Biotecnológica estadounidense (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) o *Mycobank* del Centro de Biodiversidad de Hongos holandés (CBS, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*) y otras más específicas como las desarrolladas para la identificación de *Aspergillus* spp. (Cerqueira GC *et al.*, 2014) o *Fusarium* spp. (Park B *et al.*, 2011). También existen bases de datos de acceso restringido, como la desarrollada en el Servicio de Micología que contiene más de 10 000 secuencias.

Las técnicas que permiten el estudio de las relaciones filogenéticas entre las especies fúngicas permiten profundizar en el proceso de identificación de las mismas. El

análisis múltiple de secuencias variables (MLSA, *Multi-locus Sequence Analysis*) se basa en la amplificación de distintos genes y su posterior análisis conjunto (Glaeser SP y Kampfer P, 2015). Es una técnica muy utilizada en organismos procariotas y, poco a poco, se ha establecido en el campo de la taxonomía fúngica. Esta técnica se ha empleado, por ejemplo, para discernir entre los distintos sub-grupos o sub-especies de *H. capsulatum* (Kasuga T *et al.*, 1999; Kasuga T *et al.*, 2003; Rodríguez-Arellanes G *et al.*, 2013) o para diferenciar las distintas especies patógenas de *Emmonsia* spp. (Kenyon C *et al.*, 2013). Sobre esta base se han desarrollado métodos de tipificación *multi-locus* de secuencias (MLST, *Multi-Locus Sequence Typing*) que permiten la discriminación a nivel de especie e incluso de sub-especies, variedades o cepas (Pérez-Losada M *et al.*, 2013). Muchos de los resultados obtenidos, empleando estos métodos, se encuentran públicamente accesibles en plataformas web (<http://mlst.mycologylab.org/>; <http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/>).

1.4.3. Métodos basados en el análisis de las curvas de fusión

Esta técnica se basa en el análisis de las curvas de fusión obtenidas tras el calentamiento del fragmento diana amplificado mediante PCR, en presencia de un agente intercalante fluorescente (**Figura 1.4**). La forma y posición de esta curva de fusión depende del ratio de bases nucleotídicas (GC/AT) y del tamaño del producto de PCR, permitiendo diferenciar fragmentos con cambios en su secuencia de hasta un nucleótido, eliminando la necesidad de electroforesis (Odell ID *et al.*, 2005). Este análisis se puede realizar en la última etapa de la qPCR evitando, de este modo, la secuenciación (Alonso M *et al.*, 2012; Bezdicek M *et al.*, 2016; Bu R *et al.*, 2005; Somogyvari F *et al.*, 2012). Sin embargo, el poder de discriminación de la técnica está limitado a un cierto número de genotipos ya que, conforme aumenta el rango de variantes identificables, aumenta la dificultad para discriminar unas de otras.

Por último, una aplicación muy utilizada actualmente es el análisis de curvas de fusión de alta resolución o HRMA (*High Resolution Melting Analysis*). Esta técnica se ha utilizado ampliamente como método de cribado de variantes genéticas en distintos tipos de cáncer y, más recientemente, como método de genotipado en humanos y bacterias (Reed GH *et al.*, 2007). En el campo de la micología médica los trabajos son más limitados,

pero algunos estudios recientes han permitido distinguir entre especies de un mismo género o grupo (Gago S *et al.*, 2011; Hrnčirova K *et al.*, 2010).

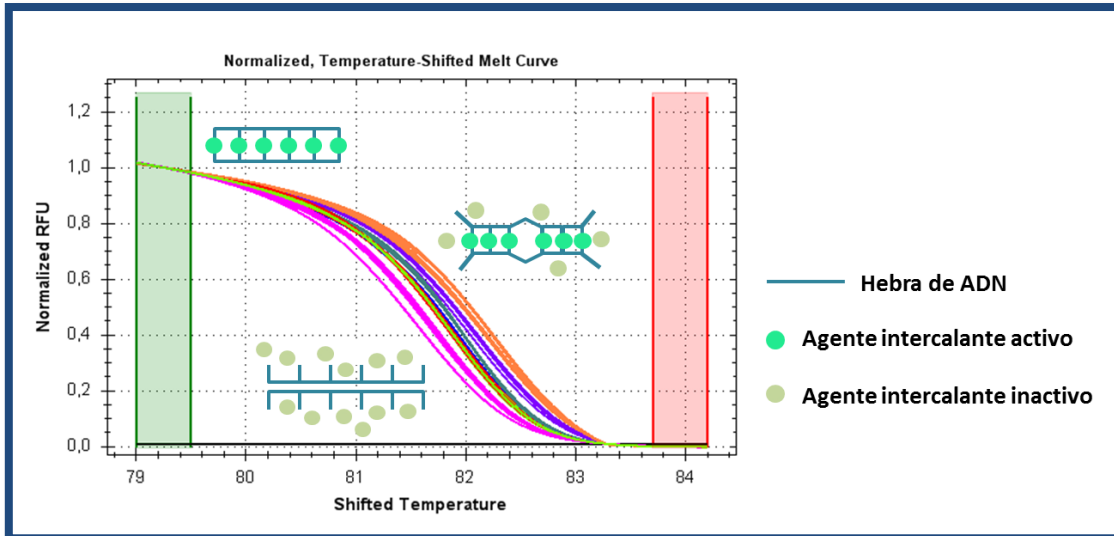


Figura 1.4. Esquema de la formación de las curvas de fusión tras la amplificación mediante PCR. (Imagen cedida por la Dra. Sara Gago Prieto). Al finalizar la qPCR, el agente intercalante satura la doble cadena de ADN del fragmento amplificado. Con el calentamiento, el producto de PCR va a ser desnaturado gradualmente y rápidamente renaturalizado, lo que ocasionará cambios en la fluorescencia que podrán ser registrados por el equipo de qPCR y analizados mediante un programa informático adecuado (Reed GH *et al.*, 2007).

1.4.4. Métodos basados en la espectrometría de masas: EM MALDI-ToF

La EM MALDI-ToF ha supuesto una revolución en la identificación de microorganismos, a partir del cultivo, en los laboratorios de microbiología clínica. Aunque no existen estadísticas de su implantación real en nuestro país, actualmente funcionan unos 65 equipos en diferentes laboratorios (Cantón R y García-Rodríguez J, 2016).

El fundamento de la técnica se basa en la ionización y evaporación de la muestra embebida en una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, mediante la incisión de un láser, dando como resultado la llamada "huella peptídica", donde predominan proteínas ribosomales que son las más abundantes del organismo (**Figura 1.5**). Este espectro, tras un proceso de normalización, se compara con una base de datos de perfiles proteicos o "librería" para identificar el organismo presente en la muestra de partida (Randell P, 2014).

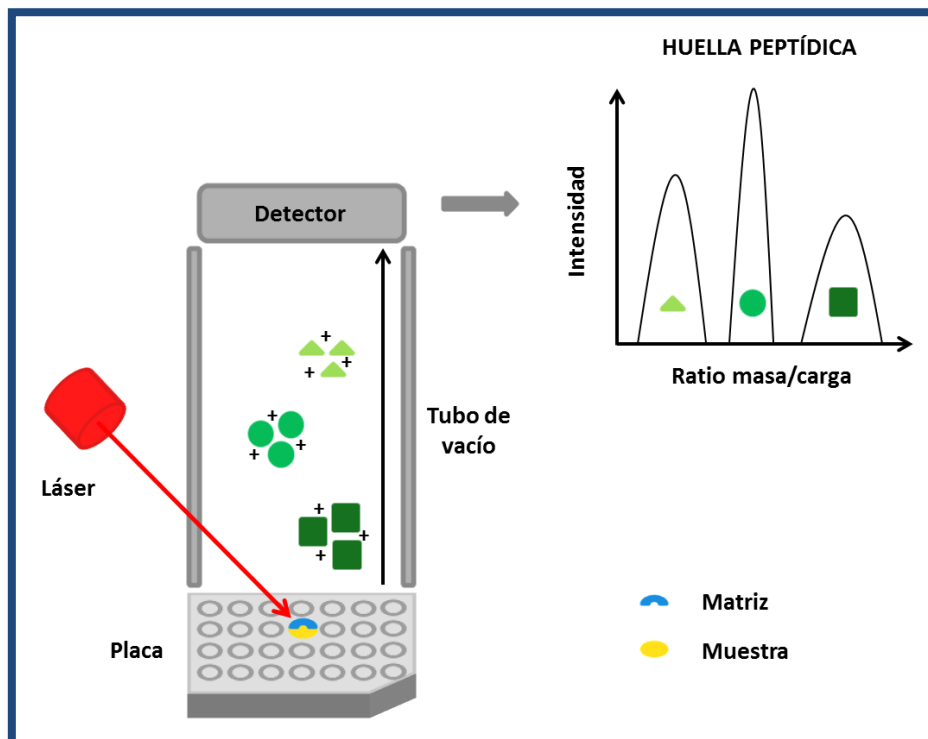


Figura 1.5. Esquema del proceso de adquisición de espectros mediante la técnica EM MALDI-ToF. A través de la aplicación de una aceleración de voltaje, las partículas ionizadas por el láser viajan a lo largo de un tubo de vacío hasta un detector donde se separan por su ratio masa/carga. Allí se genera un espectro o “huella peptídica”, con picos que representan la masa de la partícula y cuya altura indica la intensidad de la señal detectada (Randell P, 2014).

Existen distintos equipos y sistemas comercializados, siendo los más usados *MALDI Biotyper* (*Bruker Daltonics*, Alemania) y *VITEK MS* (*bioMérieux*, Francia). Ambos presentan un rendimiento similar, pero varían en la base de datos de referencia que facilitan y en el soporte informático, algoritmos y puntos de corte que utilizan para el proceso de identificación (Quiles-Melero I *et al.*, 2016).

El recorrido de la EM MALDI-ToF en el campo de la micología médica es significativamente menor que en el de la bacteriología debido, principalmente, a la complejidad biológica de los hongos y a la coexistencia de distintos fenotipos, incluso dentro del mismo organismo, lo que dificulta la puesta a punto del método. A esto se suma que la cantidad de espectros de especies fúngicas, especialmente de hongos filamentosos, en las bases de datos comerciales sigue siendo baja (Posteraro B *et al.*, 2013). En general, cuando se trabaja con especies fúngicas, hay dos factores muy importantes que influyen en el rendimiento de la técnica:

i) El método de extracción: el procedimiento más empleado en bacteriología es el método directo que consiste en aplicar la matriz al material biológico intacto. Este método es adecuado para algunas levaduras, pero poco eficiente para hongos filamentosos debido a que tienen una pared celular más difícil de romper. Cuando se trabaja con hongos en fase filamentosa, el método que mejor resultados ofrece es el que consiste en fijar las células con etanol, romper la pared aplicando ácido fórmico (diluido en agua al 70%) y añadir acetonitrilo para aumentar la solubilidad de las proteínas (Bader O, 2013). Además, este es el método utilizado para la creación de la base de datos de referencia del sistema *MALDI Biotyper*.

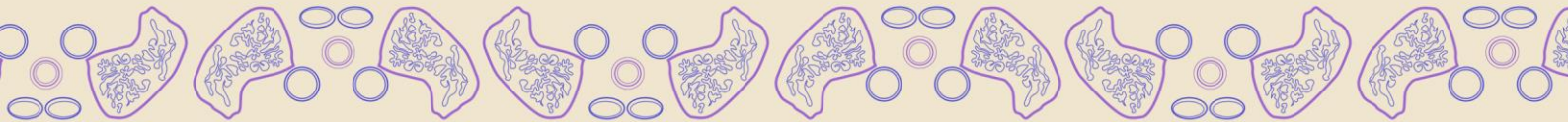
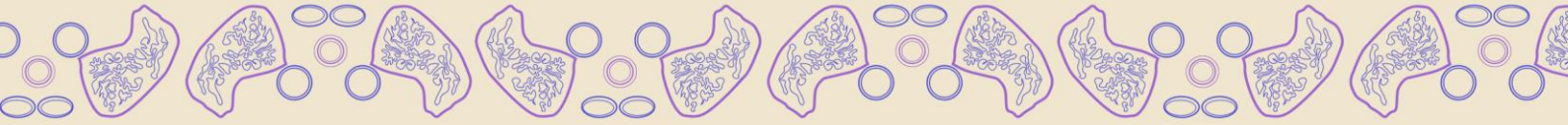
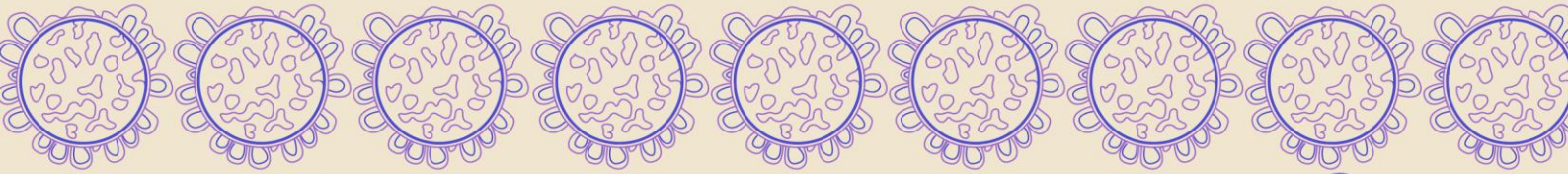
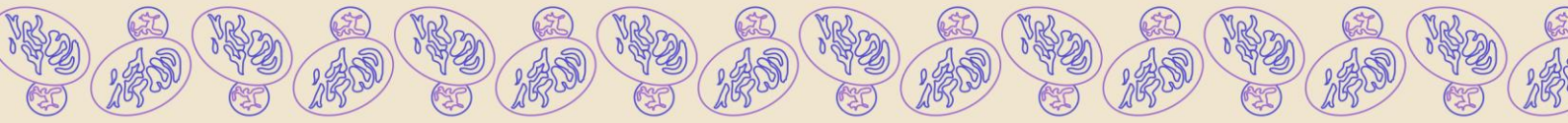
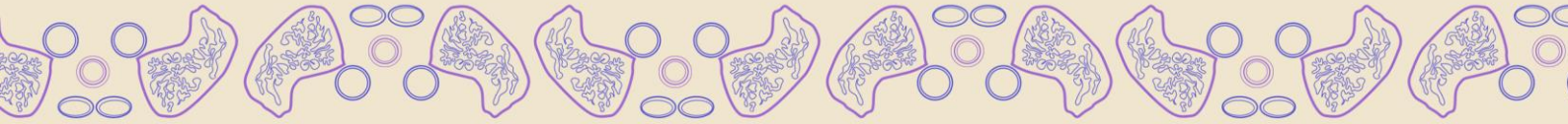
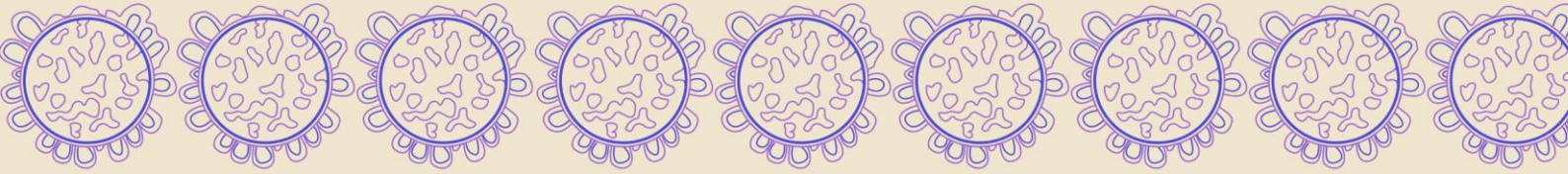
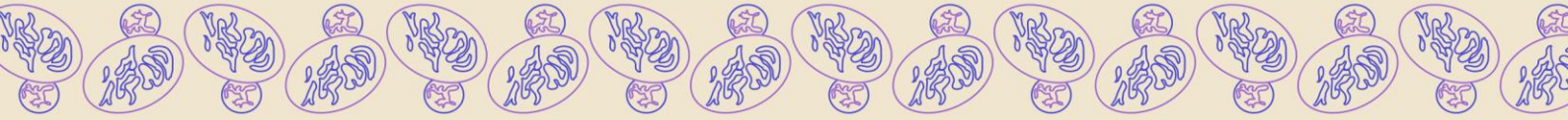
ii) La base de datos con la que se compara el espectro: puesto que las bases de datos comerciales incluyen pocos registros de espectros proteicos fúngicos, la ampliación de estas con nuevos espectros es una de las formas de mejorar la eficiencia de la identificación, ya que aumenta el rango de especies que se pueden identificar con este método (Sanguinetti M y Posteraro B, 2017). En este sentido, se ha descrito que el aumento del número de réplicas de cada cepa y la inclusión de varias cepas de una misma especie contribuyen a una identificación más precisa (Normand AC *et al.*, 2013).

En estos últimos años se han ido desarrollando protocolos para grupos concretos de hongos como *Aspergillus spp.*, Mucorales, *Fusarium spp.* y *Scedosporium spp.* (Alanio A *et al.*, 2011a; Coulibaly O *et al.*, 2011; de Carolis E *et al.*, 2012; Schrödl W *et al.*, 2012; Sitterlé E *et al.*, 2014; Sleiman S *et al.*, 2016) o para grupos amplios de especies clínicamente relevantes (Becker PT *et al.*, 2014; Cassagne C *et al.*, 2011; Gautier M *et al.*, 2014; Lau AF *et al.*, 2013). Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios en otros grupos como los hongos endémicos y las especies fúngicas raras o poco comunes.

Las principales ventajas de esta técnica para la identificación de especies fúngicas son: i) la disminución del tiempo de respuesta, ii) el gran poder de discriminación y iii) la gran precisión y seguridad en el análisis. Sin embargo, las mayores limitaciones son la necesidad de estandarizar los métodos de extracción proteica y de ampliar las bases de datos disponibles (Quiles-Melero I *et al.*, 2016).



2. Objetivos



De acuerdo con la necesidad de nuevas herramientas de diagnóstico e identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas, se plantean los siguientes objetivos en esta tesis:

OBJETIVO PRIMERO: DIAGNÓSTICO MOLECULAR PANFÚNGICO

Desarrollo y validación de una nueva técnica de qPCR de amplio rango (panfúngica) para el diagnóstico precoz de neumonías oportunistas y otras infecciones fúngicas.

OBJETIVO SEGUNDO: MEJORA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA NEUMOCISTOSIS

Cuantificación de diferentes dianas mitocondriales de *P. jirovecii* respecto al genoma nuclear.

OBJETIVO TERCERO: DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE *Histoplasma capsulatum*

Desarrollo y validación de una base de datos de perfiles proteicos para la identificación de *H. capsulatum* mediante la EM MALDI-ToF.

OBJETIVO CUARTO: ESTUDIO DE LA HISTOPLASMOSIS AFRICANA FUERA DE ZONA ENDÉMICA

Estudio de la histoplasmosis africana fuera de zona endémica y evaluación de diferentes métodos de identificación de las variedades patógenas de *H. capsulatum*.



3. Objetivo primero

DIAGNÓSTICO MOLECULAR PANFÚNGICO

Desarrollo y validación de una nueva técnica de qPCR de amplio rango (panfúngica) para el diagnóstico precoz de neumonías oportunistas y otras infecciones fúngicas.

Publicación original: Valero C, de la Cruz-Villar L, Zaragoza Ó, Buitrago MJ. New panfungal real-time PCR assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2016, 54 (12): 2910-2918. doi: 10.1128/JCM.01580-16.



El diagnóstico de las infecciones fúngicas, entre ellas las neumonías fúngicas oportunistas, es complicado debido a las limitaciones de los métodos convencionales y al amplio espectro de hongos que causan infecciones en el paciente inmunodeprimido. Las técnicas moleculares basadas en la qPCR de amplio rango o panfúngica, suponen una gran ventaja cuando no existe una sospecha clara de la especie involucrada en la infección. Sin embargo, en la mayoría de los estudios desarrollados, se requiere la secuenciación del fragmento de ADN amplificado, lo que implica un retraso en el tiempo de respuesta que puede ser decisivo para el pronóstico del paciente.

En este trabajo se diseñó una nueva qPCR panfúngica basada en la combinación de tres metodologías: i) la detección de ADN fúngico mediante un agente intercalante y cebadores universales, ii) la detección a nivel de género o de grupos de especies fúngicas mediante sondas *molecular beacon* y iii) la identificación a nivel de especie mediante el análisis de curvas de fusión.

La técnica se estandarizó *in vitro* con 11 especies de la colección del Servicio de Micología y se realizó un test de especificidad con 18 especies distintas y ADN de ratón y humano. Además, se construyó una base de datos de curvas de fusión con los datos

Objetivo primero

obtenidos durante la estandarización de la técnica. Finalmente, la técnica se validó con 60 muestras, mayoritariamente biopsias, de pacientes con infección fúngica probada y probable.

Los valores de sensibilidad y especificidad generales fueron 83,3% y 100%, respectivamente, pudiéndose evitar la secuenciación en el 67,8% de los casos positivos, lo que implica un adelanto considerable del tiempo de respuesta. Estos resultados indican que la técnica es rápida, sensible y específica, y puede ser útil para mejorar el diagnóstico temprano de las neumonías fúngicas oportunistas sin sacrificar la detección de otro tipo de micosis.

New Panfungal Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections

Valero C¹, de la Cruz-Villar L¹, Zaragoza Ó¹, Buitrago MJ^{1*}

¹Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid), Spain.

**Corresponding author: Dr. María José Buitrago. Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Carretera Majadahonda-Pozuelo Km2. 28220 (Madrid), Spain. e-mail: buitrago@isciii.es. Phone: +34-91-8223425 and Fax: +34-91-5097919.*

ABSTRACT

The diagnosis of invasive fungal infections (IFIs) is usually based on the isolation of the fungus in culture and histopathological techniques. However, these methods have many limitations often delaying the definitive diagnosis. In recent years, molecular diagnostic methods have emerged as a suitable alternative for IFI diagnosis. When there is not a clear suspicion of the fungus involved in the IFI, panfungal real-time PCR assays have been used, allowing amplification of any fungal DNA. However, this approach requires subsequent amplicon sequencing to identify the fungal species involved, increasing response time. In this work, a new panfungal real-time PCR assay using the combination of an intercalating dye and sequence-specific probes was developed. After DNA amplification, a melting curve analysis was also performed. The technique was standardized by using 11 different fungal species and validated in 60 clinical samples from patients with proven and probable IFI. A melting curve database was constructed by collecting those melting curves obtained from fungal species included in the standardization assay. Results showed high reproducibility (coefficient of variation (CV)<5%; $r>0.95$) and specificity (100%). The overall sensitivity of the technique was 83.3%, with the group of fungi involved in the infection detected in 77.8% of the positive samples with IFIs covered by molecular beacon probes. Moreover, sequencing was avoided in 67.8% of these “probe-positive” results, enabling report of a positive result in 24h. This technique is fast, sensitive, and specific and promises to be useful for improving early diagnosis of IFIs.

INTRODUCTION

Invasive fungal infections (IFIs) remain a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients, and diagnosis continues to be problematic (1). Laboratory diagnosis of IFIs is based on classical methods such as fungus isolation in culture and histopathological examination; however, these methods present several limitations. Fungal cultures are frequently slow growing, and such assays are low in sensitivity as well as in specificity because fungi are habitual laboratory contaminants and part of the

saprophytic human flora (2). Furthermore, histopathological studies show low sensitivity, require skilled personnel, and do not distinguish among fungal species (3), which is problematic since such distinctions are crucial in order to define an appropriate antifungal therapy, due to the differences in antifungal susceptibility exhibited by different fungal species (4).

In recent years, molecular methods, such as PCR assays, have emerged as a suitable alternative to conventional methods for the diagnosis of IFIs. These assays have a higher sensitivity as they allow the detection of small

amounts of DNA in clinical samples. In addition, those protocols based on quantitative real-time PCR (qPCR) have the benefit of quantifying the fungal burden in clinical specimens (5). Several qPCR protocols have been developed for the diagnosis of IFIs, mainly for *Aspergillus* and *Candida* species (6) but also for less frequent fungal species (7, 8, 9, 10). However, the utility of a species or genus-specific approach is limited when there is not a clear suspicion of the fungus involved in the IFI. To solve this limitation, panfungal or broad-range fungal PCR assays have been described as an appropriate alternative. However, these techniques also present the inconvenience of the requirement of sequencing after amplification, which involves a delay in definite diagnosis. To date, several studies based on panfungal PCR showing suitable results (11, 12, 13) and demonstrating its usefulness in certain groups of patients, such as hemato-oncology patients (14) and immuno-compromised pediatric patients (15), have been described.

Melting curve analysis has been reported by several authors as a fast, reliable, and cost-effective method to identify fungal species while avoiding sequencing (16, 17, 18, 19, 20). Moreover, a combination of probe detection and high-resolution melting analysis has been already used for detecting and identifying *Aspergillus* spp. from clinical samples (21). However, to our knowledge, this is the first method developed for IFI diagnosis that combines panfungal and species-specific detection with species identification by using melting curve analysis in the same run.

In this work, a panfungal qPCR assay combining a DNA binding dye and specific molecular beacon probes followed by a melting curve analysis has been designed in order to detect a wide range of fungal species and decrease response time by avoiding sequencing as far as possible. The technique has been standardized and validated for clinical strains and clinical samples from patients with proven and probable IFI. The aim of this study was to

improve early diagnosis of IFIs in patients when there is not a clear suspicion of the fungus involved in the infection.

MATERIALS AND METHODS

Control strains

All strains included in the assay belonged to the fungal collection of the Spanish National Centre for Microbiology. DNA from the following organisms (strains in parentheses) was used to standardize the new panfungal qPCR assay: *Rhizopus oryzae* (CNM-CM 3020), *Rhizopus microsporus* (CNM-CM 4244), *Mucor circinelloides* (CNM-CM 2437), *Aspergillus flavus* (CNM-CM 3509), *Aspergillus terreus* (CNM-CM3508), *Aspergillus fumigatus* (CNM-CM 2580), *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (CNM-CM 2721), *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* (CNM-CM 4626), *Coccidioides immitis* (CNM-CM 7056), *Coccidioides posadasii* (CNM-CM 2911), *Paracoccidioides brasiliensis* (CNM-CM 2908), and *Blastomyces dermatitidis* (CNM-CM 3114).

To assess the specificity of the technique, the following yeast and mold strains were used: *Scedosporium apiospermum* (CNM-CM 3169), *Scedosporium prolificans* (CNM-CM 1627), *Fusarium solani* (CNM-CM 3530), *Fusarium oxysporum* (CNM-CM 3197), *Cunninghamella elegans* (CNM-CM 7046), *Penicillium commune* (CNM-CM 7192), *Cryptococcus gattii* (CNM-CL 5007), *Cryptococcus neoformans* (CNM-CL 5801), *Candida albicans* (CNM-CL 8701), *Candida krusei* (CNM-CL 7057), *Candida parapsilosis* (CNM-CL 5683), *Candida glabrata* (CNM-CL 7523), *Candida tropicalis* (CNM-CL 8796), *Candida guilliermondii* (CNM-CL 7127), *Rhizomucor pusillus* (CNM-CM 2751), *Actinomucor elegans* (CNM-CM 1722), *Lichtheimia corymbifera* (CNM-CM7053), and *Lichtheimia ramosa* (CNM-CM 7130). With the aim of evaluating the detection of *Aspergillus* spp. and *Mucor* spp., the following strains were also included: *Aspergillus lentulus* (CNM-CM 6069), *Aspergillus niger* (CNM-CM

4352), *Aspergillus viridinutans* (CNM-CM 5623), *Neosartorya udagawae* (CNM-CM 6056), *Neosartorya pseudofischeri* (CNM-CM 2270), *Aspergillus novofumigatus* (CNM-CM 6098), *Aspergillus ustus* (CNM-CM 4212) *Mucor plumbeus* (CNM-CM 5245), *Mucor velutinosus* (CNM-CM 6560), and *Mucor irregularis* (CNM-CM 7301).

Primer and probe design

Primers used in the assay were the universal primer ITS1 and a modified universal primer, ITS2 (22), which was redesigned with two degenerated positions to avoid deviation in the amplification efficiency among species (ITS2Deg2). Five molecular beacon probes

labeled with different fluorescent dyes were designed to specifically target the ITS1 region of the rDNA from different groups of fungal species (*Aspergillus* spp., Mucorales, and fungi involved in endemic mycoses) based on a large database of internal transcribed spacer (ITS) sequences (containing more than 10 000 distinct sequences). Beacon Designer 7.0 software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA) was used for probe design. The primers and probes designed were subjected to a BLAST search within the GenBank sequence database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to avoid cross-homology with other microorganisms. Sequences of primers and probes used in this assay are shown in **Table 1**.

Table 1. Sequences of primers and probes designed for the new panfungal qPCR assay^a.

Primer or probe ^b	Sequence
Primers	
ITS1 (f)	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS2 (r)	5'-GCTRCGTTCTTCATCGATRC-3'
Probes	
PanAspDeg	5'-ROX- <u>CGCGATCAACCTCCCACCCGTGWCTAYYGTACCGATCGCG</u> -BHQ2-3'
PanRhiz	5'-HEX- <u>CGCGATTTCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCGCG</u> -BHQ1-3'
PanMuc	5'-HEX- <u>CGCGATCGGCTTGGTATCCTATTATTATTTACAAAAAGAATTGATCGCG</u> -BHQ1-3'
PanHBP	5'-Cy5- <u>CGCGATTCGGCGGGCCTGCAGCGATCGCG</u> -BHQ2-3'
PanCocci3	5'-Cy5- <u>CGCGATCGCGCCTGCCAGYGGATCAATTATCGCG</u> -BHQ2-3'

^af: forward; r: reverse; **BHQ1**: black hole quencher 1; **BHQ2**: black hole quencher 2. Degenerated positions are in bold, and stem regions are underlined.

^bPrimers were used to amplify the ITS1 region from the fungal rDNA. Molecular beacon-specific probes were designed to detect each group of fungi, as follows: MB-PanAspDeg, *Aspergillus* species; MB-PanRhiz, *Rhizopus* species; MB-PanMuc, *Mucor* species; MB-PanHBP, *Histoplasma*, *Blastomyces*, and *Paracoccidioides* species; MB-PanCocci3, *Coccidioides* species.

Panfungal real-time PCR assay

The amplification assay was carried out in an LC480 unit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). PCRs were performed in a 20µl final volume containing 2x SensiMix II Probe No-ROX (Bioline, Ecogen, Madrid, Spain), 0.8µM each primer, 0.2µM MB-PanAspDeg, 0.2µM MB-PanMuc, 0.1µM MB-PanRhiz, 0.3µM MB-PanHBP, 0.3µM MB-PanCocci3, and 1x Resolight binding dye (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) diluted 16 times. Finally, 2µl of genomic DNA from control strains or 2 or

4µl of DNA extracted from samples was added to PCRs in standardization and validation experiments, respectively. PCR conditions were as follows: an initial step of 10min at 95 °C, followed by 50 cycles at 95 °C for 10s, 54 °C for 30s, and 72 °C for 30s and a cooling phase of 30s at 40 °C. Melting curves were generated by increasing the temperature from 65 °C to 99 °C at 0.29 °C/s. Results were considered positive when the fluorescent signal above the baseline was detected as determined by second-derivative analysis and were expressed in terms

of the quantification cycle (Cq). Each experiment included quantification standards of five species of fungi as well as negative controls. Subsequently, a color compensation experiment was performed to prevent cross talk between dyes.

Standardization

Standard curves for the fungal species mentioned above in “Control strains” were obtained based on the result of five PCR repetitions with 10-fold serial dilutions of genomic DNA ranging from 1ng to 0.1fg/ μ l of reaction mixture. Two replicates of each dilution were included in each PCR repetition to evaluate the intra-reproducibility of the technique. Regression lines were obtained by plotting the logarithm of the initial template concentration versus the corresponding Cq, and the standard curve was then used to determine the sensitivity, primer efficiencies, and reproducibility of the assay. In addition, the coefficient of variation (CV) was determined in each case. To evaluate the specificity of the technique, 0.1ng/ μ l of genomic DNA from 18 fungal species as well as mouse and human DNA (Promega, Madrid, Spain) was included in duplicate in the PCR assay.

Melting curve database construction

Melting curves of each PCR product were obtained by measuring the fluorescence of the Resolight Dye at different temperatures (from 65 °C to 99 °C) and analyzed by using the melting curve genotyping analysis included in LightCycler 480 Software v. 1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Melting curves were automatically displayed as a melting curve chart (fluorescence (F) versus temperature (T)) and plotted by representing the first negative derivative melting curve (-df/dt) versus temperature, where the center of the melting peak corresponded to the point of inflection of the melting curve. This point of inflection represents the melting temperature

of the PCR product. A melting curve database was generated by collecting, as external melting standards, those melting curves generated for each species included in the standardization assay presenting the best quality.

Validation assay in clinical samples

The usefulness of the new panfungal qPCR assay was evaluated using 60 clinical samples. Thirty-seven of the 60 clinical samples belonged to patients with proven IFI, and the remaining 23 belonged to patients with probable IFI, classified according to the EORTC/MSG criteria (23). Of the IFI samples, 17 samples belonged to patients with invasive aspergillosis, 11 with mucormycosis, 10 with infection by endemic mycoses, 9 with candidiasis, and 13 with IFIs caused by emerging or rare fungal species (Table 2). The origins of the samples were as follows: 44 were biopsy specimens (35 being fresh and the remaining paraffin-embedded biopsy specimens), 8 were respiratory samples (5 bronchoalveolar lavage fluids, 2 broncho-aspiration specimens, and 1 tracheal aspirate), 5 were cerebrospinal fluids (CSF), 1 was aqueous humor fluid, and 1 was a nail sample. DNA extraction from clinical samples was performed manually by using a QIAamp DNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions and as already described by Buitrago MJ *et al* (24) without any preprocessing step. Biopsy samples embedded in paraffin were deparaffinized by lavage with 1.5 ml of xylene (100%) followed by two lavages with 1.2 ml of ethanol (96 to 100%) and an incubation of the tissue at 37 °C to evaporate the remains of the ethanol. Volumes of 2 and 4 μ l of DNA extracted from each sample were used for each PCR assay. All PCR products obtained from clinical samples were run in 2% ethidium bromide-stained agarose gels (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain) to verify amplification and the quality of the amplified products.

Table 2. Species distribution and sensitivity of the new panfungal qPCR assay for 60 clinical samples included in the validation assay^a.

Clinical group and fungal organism (no. of samples)	No. of organisms identified to species or genus level by:		
	Panfungal qPCR ^b	Molecular beacon ^c	Melting curve ^d
Proven IFI (37)	29	18 (62.1%)	15 (51.7%)
<i>Aspergillus</i> spp. (6)	6	6	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> (2)	2	2	1
<i>Aspergillus flavus</i> (3)	3	3	2
<i>Aspergillus penicilloides</i> (1)	1	1	1
Mucormycetes (10)	7	6	5
<i>Rhizopus oryzae</i> (7)	5	5	3
<i>Rhizopus microsporus</i> (1)	1	1	1
<i>Lichtheimia ramosa</i> (1)	1	0	1
<i>Rhizomucor pusillus</i> (1)	0	0	0
Endemic mycoses (10)	6	6	4
<i>Histoplasma capsulatum</i> (8)	4	4	2
<i>Coccidioides immitis</i> (1)	1	1	1
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (1)	1	1	1
<i>Candida</i> spp. (3)	3	0	2
<i>Candida albicans</i> (2)	2	0	1
<i>Candida glabrata</i> (1)	1	0	1
Other (8)	7	0	0
<i>Fusarium</i> sp. (1)	1	0	0
<i>Cryptococcus neoformans</i> (1)	1	0	0
<i>Phoma exigua</i> (1)	0	0	0
<i>Bipolaris spicifera</i> (1)	1	0	0
<i>Microspheeropsis arundinis</i> (1)	1	0	0
<i>Pythium insidiosum</i> (1)	1	0	0
<i>Cladophialophora bantiana</i> (1)	1	0	0
<i>Emmonsia crescens</i> (1)	1	0	0
Probable IFI (23)	21	10 (47.6%)	7 (33.3%)
<i>Aspergillus</i> spp. (11)	10	9	7
<i>Aspergillus fumigatus</i> (6)	6	6	4
<i>Aspergillus flavus</i> (3)	3	2	2
<i>Aspergillus terreus</i> (1)	1	1	1
<i>Aspergillus nomius</i> (1)	0	0	0
Mucormycetes (1)	1	1	0
<i>Rhizopus oryzae</i> (1)	1	1	0
<i>Candida</i> spp. (6)	6	0	0
<i>Candida albicans</i> (2)	2	0	0
<i>Candida parapsilosis</i> (2)	2	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (2)	2	0	0
Other (5)	4	0	0
<i>Scedosporium</i> sp. (1)	1	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> (1)	1	0	0
<i>Acremonium</i> sp. (1)	1	0	0
<i>Exophiala</i> sp. (1)	0	0	0
<i>Schizophyllum commune</i> (1)	1	0	0
Total (60)	50	28 (56%)	22 (44%)

^aValues in last three columns are numbers (percentage relative to positive samples by panfungal qPCR) of samples in which the organism was identified.

^bOverall identification of fungal species by the new panfungal qPCR assay by positive signal of Resolight dye followed by sequencing.

^cIdentification of species or genus by positive signal of molecular beacon probes.

^dIdentification of fungal species by melting curve analysis.

Objetivo primero

Then, PCR products were purified by using the High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and sequenced (ABI 3730 XL; Applied Biosystems, Madrid, Spain) with ITS1 and ITS2Deg2 primers to verify the results. The sequences obtained were compared with those available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nih.gov/GenBank/>) and the sequence database belonging to the Mycology Department, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

RESULTS

In vitro standardization of the qPCR assay

The newly designed panfungal qPCR assay

detected the DNAs from 11 fungal species included in the standardization assay. Each species was detected in the panfungal detection channel (FAM, 483 to 533 nm) and in the specific channel depending on the species tested (HEX, 523 to 568 nm, for Mucorales species; ROX, 558 to 610 nm, for *Aspergillus* spp.; or Cy5, 615 to 670 nm, for fungi causing endemic mycoses). Detection limits were established between 0.1 and 100fg of DNA per μl , and CV values were within the acceptable limit of <5% in all cases, with the exception of *C. posadasii*. Quantification was linear for all fungal species included in the assay, and the standard curve generated showed a coefficient of determination between 0.95 and 0.99 in all cases (Table 3).

Table 3. Overview of standardization results of the 12 clinical strains belonging to 11 fungal species included in the new panfungal qPCR assay^a.

Species	FAM (panfungal channel)				HEX (Mucorales channel)				ROX (<i>Aspergillus</i> spp. channel)				Cy5 (endemic mycosis fungus channel)			
	S	R ²	CV (%)	DL (fg/ μl)	S	R ²	CV (%)	DL (fg/ μl)	S	R ²	CV (%)	DL (fg/ μl)	S	R ²	CV (%)	DL (fg/ μl)
<i>Rhizopus oryzae</i>	-3.6	0.99	2.45	0.1	-3.6	0.99	2.05	0.1								
<i>Rhizopus microsporus</i>	-3.6	0.98	1.54	0.1	-3.8	0.98	3.05	0.1								
<i>Mucor circinelloides</i>	-3.4	0.98	3.76	0.1	-3.7	0.98	4.67	1								
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-3.5	0.97	2.72	1					-4.1	0.95	3.73	1				
<i>Aspergillus flavus</i>	-3.8	0.98	3.69	1					-4.1	0.98	3.05	1				
<i>Aspergillus terreus</i>	-3.5	0.98	1.52	1					-4.1	0.98	3.6	1				
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	-3.5	0.98	2.23	1									-3.5	0.98	1.98	1
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	-3.4	0.98	2.21	10									-3.3	0.98	2.16	10
<i>Coccidioides immitis</i>	-3.5	0.96	2.9	10									-4.6	0.96	4.4	10
<i>Coccidioides posadasii</i>	-5.1	0.95	3.98	10									-6.6	0.97	1.67	100
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	-3.4	0.98	1.93	1									-3.2	0.98	0.47	1
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	-2.8	0.98	0.73	1									-2.8	0.98	0.47	1

^a S: slope of standard curve; R²: coefficient of determination; CV: coefficient of variation; DL: detection limit.

No cross-reactivity to DNA from other fungi or human or mouse was detected. Moreover, as expected, the MB-PanAspDeg probe and MB-PanMuc probes were available to detect species belonging to *Aspergillus* and *Mucor* genera, respectively.

Melting curves were obtained for all species included in the standardization assay and checked visually for those with the best quality. All representative melting curves were collected as external melting standards, and

the means of melting temperature values were noted (**Table 4**) with the aim to create a melting curve database, which was subsequently used to assess fungal species identification. In addition, melting curves of important fungal pathogens such as different species of *Candida* spp., *Fusarium* spp., and *Scedosporium* spp., which were not detected by the molecular beacon probes designed, were also included in the database (**Fig. 1**).

Table 4. Melting temperature values obtained for each clinical fungal strain used in the standardization assay of the new panfungal qPCR assay.

Strain	Species	Tm value (mean ± SD)		
		Tm1	Tm2	Tm3
CNM-CM 2580	<i>Aspergillus fumigatus</i>	83.37±0.13	89.18±0.75	93.37±0.38
CNM-CM 3509	<i>Aspergillus flavus</i>	83.68±0.69	88.06±0.82	92.64±0.08
CNM-CM 3508	<i>Aspergillus terreus</i>	83.61±0.63	87.89±0.89	93.06±0.24
CNM-CM 3020	<i>Rhizopus oryzae</i>	78.73±0.23	83.47±0.19	
CNM-CM 4244	<i>Rhizopus microsporus</i>	83.67±0.22		
CNM-CM 2437	<i>Mucor circinelloides</i>	80.68±0.43		
CNM-CM 2721	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	92.57±0.31		
CNM-CM 4626	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	92.05±1.41		
CNM-CM 7046	<i>Coccidioides immitis</i>	82.97±0.70	92.89±0.08	
CNM-CM 2911	<i>Coccidioides posadasii</i>	82.37±0.45	92.68±0.47	
CNM-CM 3114	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	91.76±0.81		
CNM-CM 2908	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	90.85±0.31		
CNM-CM 3169	<i>Scedosporium apiospermum</i>	83.68±0.07	87.74±0.06	
CNM-CM 1627	<i>Scedosporium prolificans</i>	81.85±0.06	85.84±0.05	
CNM-CM 3530	<i>Fusarium solani</i>	81.30±0.07	84.50±0.1	87.66±0.1
CNM-CM 3197	<i>Fusarium oxysporum</i>	81.05±0.06	86.80±0.08	
CNM-CM 7046	<i>Cunninghamella elegans</i>	82.84±0.02		
CNM-CM 2751	<i>Rhizomucor pusillus</i>	81.75±0.13		
CNM-CM 7192	<i>Penicillium commune</i>	81.75±0.03	87.62±0.01	92.21±0.01
CNM-CM 1722	<i>Actinomucor elegans</i>	83.81±0.18		
CNM-CM 7130	<i>Lichtheimia ramosa</i>	84.09±0.01		
CNM-CM 7053	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	83.42±0.06		
CNM-CL 8701	<i>Candida albicans</i>	82.88±0.03		
CNM-CL 5683	<i>Candida parapsilosis</i>	80.68±0.03		
CNM-CL 8796	<i>Candida tropicalis</i>	80.79±0.03		
CNM-CL 7523	<i>Candida glabrata</i>	80.20±0.05	86.53±0.07	
CNM-CL 7057	<i>Candida krusei</i>	80.87±0.01		
CNM-CL 7127	<i>Candida guilliermondii</i>	82.75±0.01		
CNM-CL 5801	<i>Cryptococcus neoformans</i>	80.69±0.01		
CNM-CL 5007	<i>Cryptococcus gattii</i>	81.40±0.03		

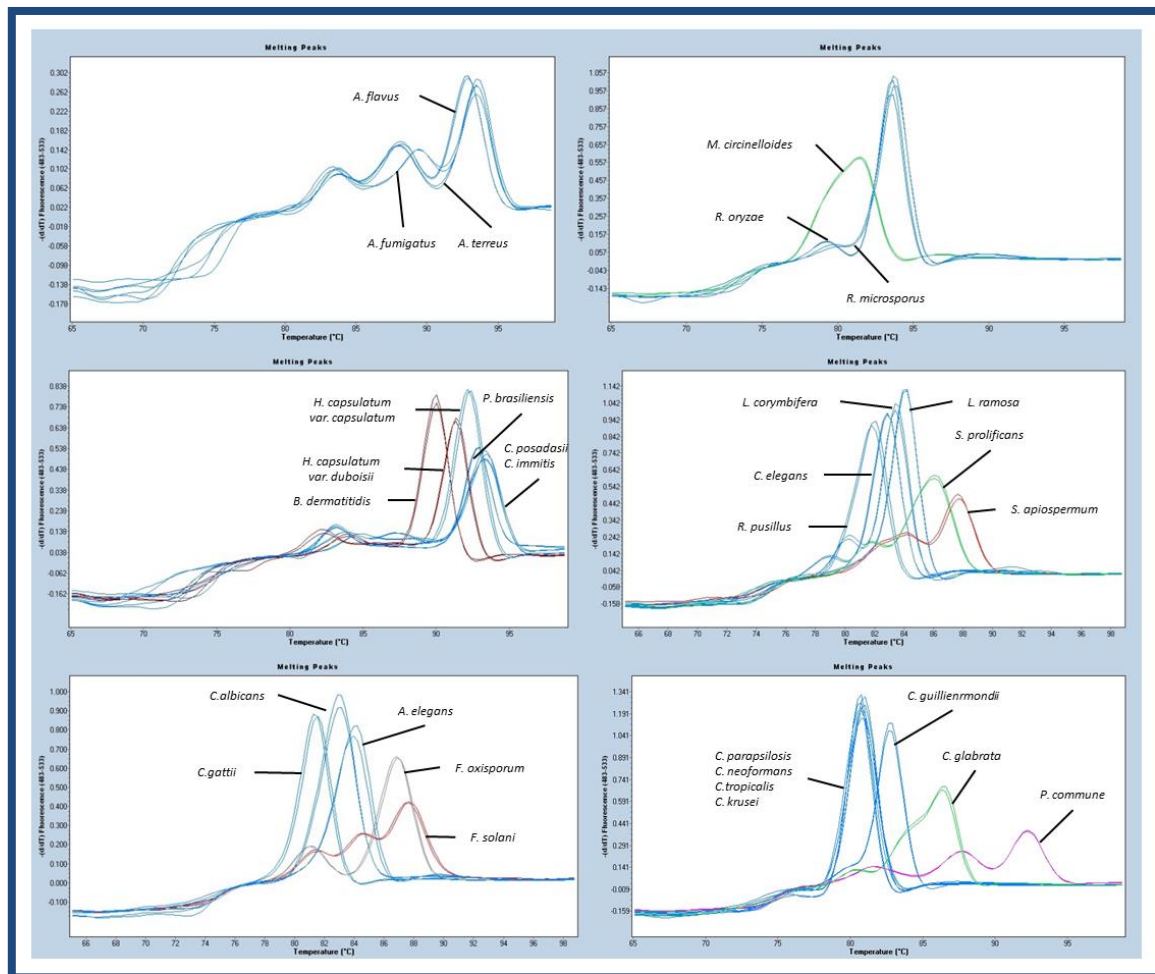


Fig. 1 Melting curves for species included in the melting curve database constructed for species identification in the new panfungal qPCR assay.

Validation of the panfungal qPCR assay in clinical samples

In order to assess the utility of this new panfungal qPCR assay, 60 clinical samples were tested. The assay was positive for 50 of the 60 clinical samples included in the validation assay (83.3%) with amplicon sequences confirming the species involved in the infection. Of the 36 cases in which causative species were susceptible to be recognized by any molecular beacon probe, we were able to identify the group of species involved in the IFI in 28 of them (77.8%). When the melting curve was analyzed in these cases, sequencing was avoided for 67.8% of them (19/28). Moreover, in the remaining 24 cases caused by species not

covered by molecular probes, we were able to define the fungal species involved in the infection by melting curve analysis in two cases of infection by *Candida* spp. and one by *Lichtheimia ramosa* (Fig. 2). The assay detected fungal DNA in 29 of 37 (78.4%) samples of patients with proven IFI, 62.1% (18/29) of them with a positive signal of molecular beacon probes and 51.7% (15/29) with positive species identification achieved by melting curve analysis. In patients with probable IFI, the assay was positive for 20 of 23 of samples (87%) with 47.6% (10/23) of them detected by molecular beacon probes and 33.3% (7/23) reporting species identification by melting curve analysis.

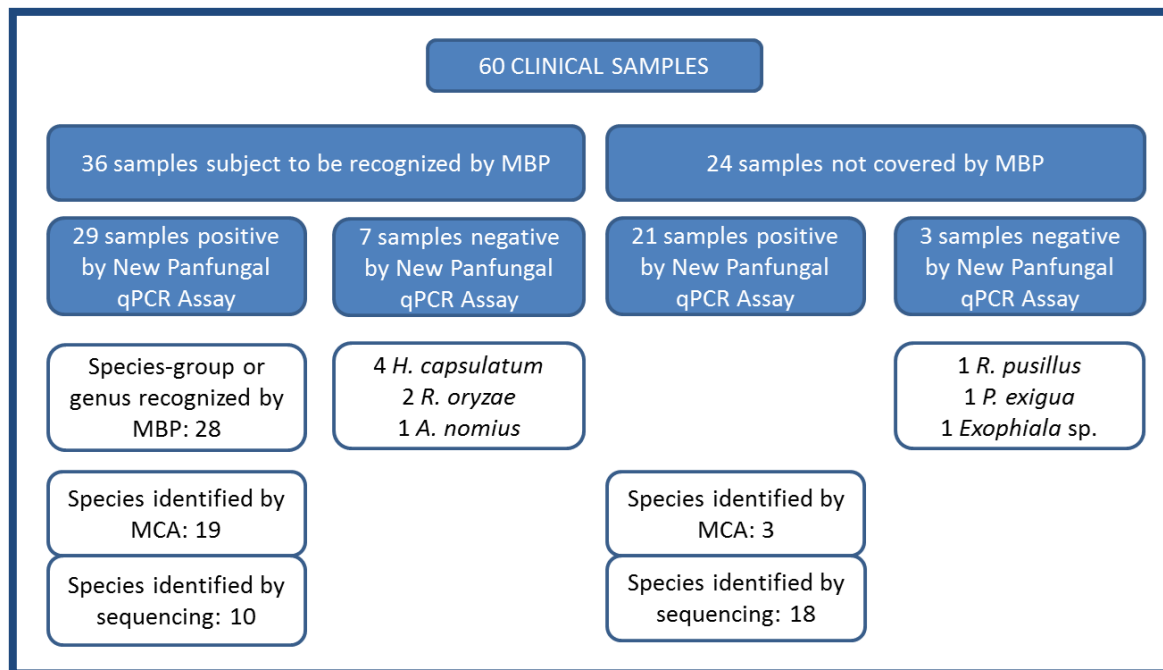


Fig. 2. Chart summarizing the results of the validation assay of the new panfungal qPCR assay. Samples were differentiated in two blocks, those that could be recognized by probes and those that were not covered by any probe. Results for each group are detailed in white boxes. **MCA:** melting curve analysis; **MBP:** molecular beacon probe.

By species, the technique detected 94% of cases containing *Aspergillus* sp. DNA, 73% of cases caused by Mucorales species, 70% of cases in which endemic fungi caused the infection (7/10), 100% of cases harboring DNA from *Candida* spp. (9/9), and 85.5% of the cases containing DNA of rare and emerging species (11/13).

Finally, 34 of the 44 biopsy specimens showed a positive result while all respiratory samples (8/8), all CSF samples (5/5), the aqueous humor fluid, and the nail sample gave a positive result. Results from the 60 clinical samples included in the study are detailed in **Table 2**. In **Fig. 3**, results for a positive sample are represented for each channel of detection of the real-time equipment.

DISCUSSION

The aim of this work was to standardize and validate a new panfungal qPCR assay to

improve diagnosis of IFIs when there is not a clear suspicion of the fungus involved in the disease. The usefulness of molecular methods based on PCR for the proper detection of fungal species in IFIs has been proven (25, 26). However, several limitations exist when the fungus causing the infection is unknown. In these cases, panfungal PCR assays have been used (27, 28) but they involve a delay in the response time because they require sequencing the amplicon. As recently described, in 30% of the samples studied from patients with IFI there was no evidence concerning the fungus implicated in the infection (24), highlighting the need for new methods.

To overcome these limitations, several authors described the differentiation among fungal species by using melting curve analysis with panfungal primers (29, 30), demonstrating the capability of this technique to replace sequencing strategies, although sensitivity in these assays was limited.

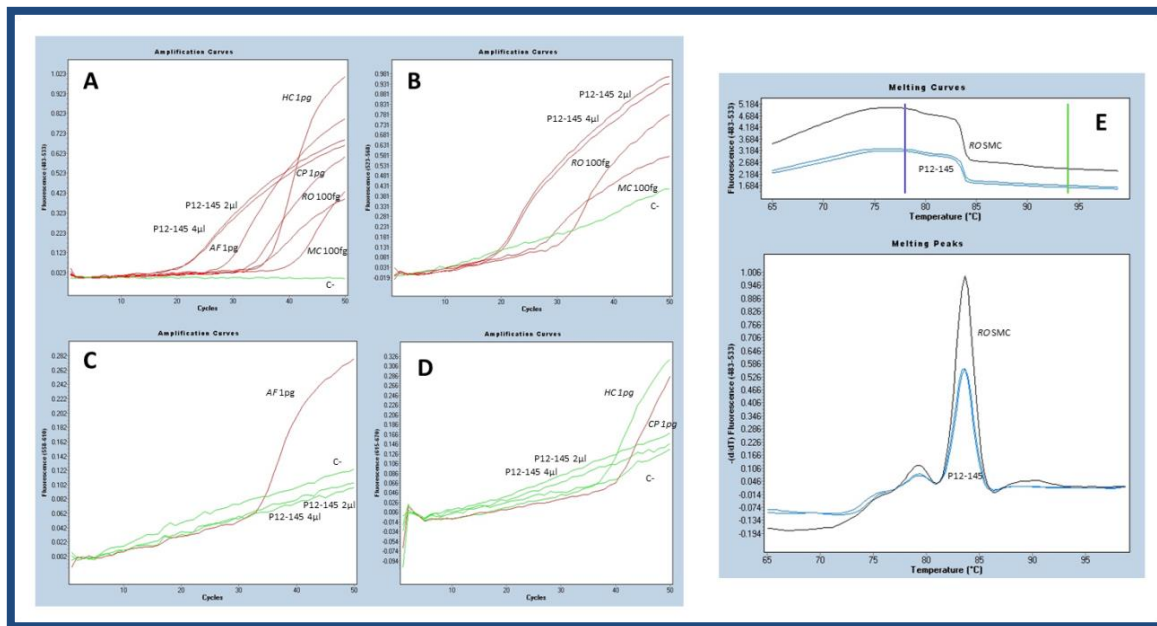


Fig.3. Dependence of fluorescence signal on the number of cycles in the new panfungal qPCR assay for patient P12-145 with proven mucormycosis caused by *R. oryzae*. **A)** Fluorescence detection in the FAM fluorescence channel, based on positive signal for the Resolight binding dye indicating panfungal amplification. **B)** Fluorescence detection in the HEX fluorescence channel, showing specific detection of *Rhizopus* sp. and *Mucor* sp. DNA and 2 and 4 μ l of DNA extracted from sample P12-145. **C)** Fluorescence detection in the ROX fluorescence channel. The positive signal corresponded to the *A. fumigatus* positive control. **D)** Fluorescence detection of Cy5 dye, showing *H. capsulatum* and *C. posadasii* positive-control amplification. **E)** Melting peaks and melting curves detected in the FAM fluorescence channel obtained by melt curve genotyping analysis. *R. oryzae* standard melting curve matched with those melting curves obtained from the P12-145 clinical sample. **RO:** *R. oryzae*; **MC:** *M. circinelloides*; **AF:** *A. fumigatus*; **HC:** *H. capsulatum*; **CP:** *C. posadasii*; **C-:** negative control; **SMC:** standard melting curve.

This new technique has been designed for the detection in one single tube of any fungal species and combines: (i) panfungal detection by using a binding dye, (ii) specific detection by using molecular beacon probes, and (iii) species identification by using melting curve analysis. Merging all these techniques in the same assay eliminates the need for sequencing the amplicon and allows for an earlier identification of the species causing the disease. **Fig. 4** shows a diagram that explains the procedures to perform when using this new technique and also the time savings. Those samples with positive panfungal detection, positive probe detection, and a successful melting curve analysis may be reported as positive results within 24h. When probe detection and melting

curve analysis are negative, sequencing the amplicon becomes mandatory, increasing the response time to 120h. However, this maximum time could be reduced to 48h in those cases in which the species or genus was identified by molecular beacon probes by performing additional specific diagnostic tests. The selected design was directed to three groups of fungi (*Aspergillus* spp., Mucorales, and fungi causing endemic mycoses) by the use of five specific probes. Probes were designed using the sequence database belonging to the Mycology Department of the Instituto de Salud Carlos III, which contains a large set of ITS sequences representing a wide range of different fungal species.

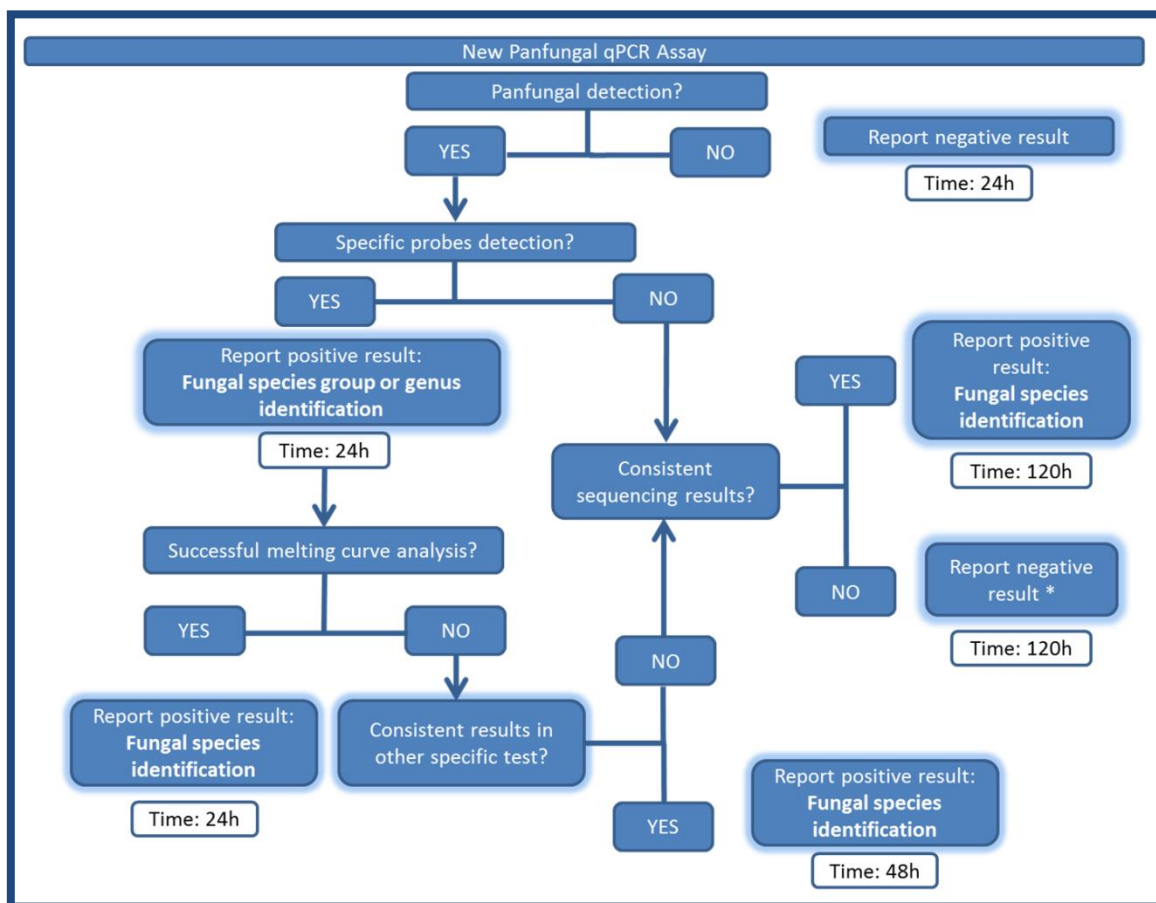


Fig. 4. Schematic diagram of procedures to perform and time-to-result analysis for this new panfungal qPCR when there is no suspicion of species involved in the IFI. *, with the exception of those cases in which species or genus was detected by molecular beacon probes, for which samples should be retested or a new sample should be requested.

Other groups of fungi were not detected by using specific probes due to the limitations of the real-time PCR equipment. Despite this limitation, the technique is open and flexible to modifications, as new probes could be designed to focus on different groups of fungi depending on the needs of the laboratories, but it must be kept in mind that fluorescent channels available in qPCR equipment are limited.

This new technique has been standardized with 12 clinical strains from 11 fungal species belonging to the collection of the Mycology Department of the Spanish Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III. During standardization, the sensitivity and reproducibility of this new panfungal qPCR were analyzed. Despite slight differences observed in detection limits described among

different fungal species, the assay was efficient in detecting all fungal species targeted by the molecular beacon probes designed. The technique also exhibited high reproducibility and specificity. Moreover, other species of *Mucor* and *Aspergillus* genera, different from those used for the standardization process, were also detected by the MB-PanMuc and MB-AspDeg probes. Finally, a database with melting curves obtained from different fungal species was constructed. This database included all species used for the standardization process and also species belonging to important fungal pathogens such as *Candida* spp., *Fusarium* spp., and *Scedosporium* spp. that were not detected by specific probes but were included in the specificity test and collected as external melting standards.

The technique was validated by using 60 clinical samples from patients with proven and probable IFI. Samples were mainly biopsy specimens (44/60), followed by respiratory samples (8/60) and others (7/60). An overall sensitivity of 83.3% was achieved, showing similar sensitivity values in patients with proven and probable IFI. We were able to provide identification to the species level for 77.8% of those cases in which fungal species were covered by molecular beacon probes. In these cases, data from melting curves helped to define the species involved in 67.8% of the cases. Although melting curve analysis failed to give a definite diagnosis in nine of those “probe-positive” cases, the results provided important information that could help to perform additional specific PCR assays or to define an appropriate antifungal therapy for the patient. In addition, in three samples the species were identified by melting curve analysis because they were not targeted by molecular beacon probes. Finally, sequencing was mandatory for 56% of positive samples (28/50) mainly due to IFIs caused by species neither recognized by any probe nor included in the melting curve database constructed. Also, this technique showed some limitations, as certain species (i.e., *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, and *C. neoformans*) exhibited similar melting curves (Fig. 1) and had large standard deviations in T_m values (Table 4) that made them indistinguishable. In these cases, complementary techniques (specific PCRs, conventional tests, etc.) should be performed to assess fungal identification. Negative results were found only for biopsy samples; however, these results are biased, as these samples are overrepresented in comparison to respiratory and other samples included in the validation assay. Also, 5 of the 10 negative cases were found in paraffin-embedded biopsy specimens. Extraction of DNA suitable for amplification from these specimens is not optimized (31, 32). To discard the possibility that DNAs from those clinical

samples with negative results were degraded, new DNA extraction was performed from five available clinical samples, but a positive result was obtained for only one sample. Of note, 7 of the negative samples harbored species that, theoretically, were susceptible to be detected by designed molecular beacon probes. However, species identification could not be achieved even by sequencing the amplicon. This could be due to a low fungal burden in the sample, the use of old, long-term-stored samples, or mixed infections, which have been described as main limitations of panfungal qPCR assays (3, 5).

In conclusion, this new panfungal qPCR assay is fast, sensitive, and specific for the detection of several fungal species in clinical samples, avoiding amplicon sequencing in many instances and shortening the time to definite diagnosis by up to 4 or 5 days. Further experiments are warranted in order to enlarge the melting curve database and expand the range of fungal species that can be detected by this technique.

FUNDING

This work, including the efforts of Maria J. Buitrago, was funded by MINECO | Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI11/00412 and PI14CIII/00045).

This work, including the efforts of Clara Valero, was funded by MINECO | Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (FI12/00095).

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

1. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4: 165rv13. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.

2. Cuenca-Estrella M, Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Rodriguez-Tudela JL. 2008. Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 2: S143-S147. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(08\)70016-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(08)70016-5).
3. Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, Bernal-Martinez L, Prieto M, Garcia-Reyne A, Garcia-Rodriguez J, Rodriguez-Tudela JL, and 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-E277. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12110>.
4. 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/dkq438>.
5. Khot PD, Fredricks DN. 2009. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7: 1201-1221. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.09.104>.
6. Kourkoumpetis TK, Fuchs BB, Coleman JJ, Desalermos A, Mylonakis E. 2012. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 54: 1322-1331. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis132>.
7. 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>.
8. Lu Q, Gerrits van den Ende AH, Bakkers JM, Sun J, Lackner M, Najafzadeh MJ, Melchers WJ, Li R, de Hoog GS. 2011. Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species by three molecular methods. *J Clin Microbiol* 49: 960-967. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01813-10>.
9. Gago S, Esteban C, Valero C, Zaragoza O, Puig dIB, Buitrago MJ. 2014. 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. *J Clin Microbiol* 52: 1168-1176. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02895-13>.
10. Muraosa Y, Schreiber AZ, Trabasso P, Matsuzawa T, Taguchi H, Moretti ML, Mikami Y, Kamei K. 2014. Development of cycling probe-based real-time PCR system to detect *Fusarium* species and *Fusarium solani* species complex (FSSC). *Int J Med Microbiol* 304: 505-511. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.03.001>.
11. Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, Halliday C. 2007. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 45: 380-385. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01862-06>.
12. Babouee B, Goldenberger D, Elzi L, Lardinois D, Sadowski-Cron C, Bubendorf L, Savic PS, Battegay M, Frei R, Weisser M. 2013. Prospective study of a panfungal PCR assay followed by sequencing, for the detection of fungal DNA in normally sterile specimens in a clinical setting: a complementary tool in the diagnosis of invasive fungal disease? *Clin Microbiol Infect* 19: E354-E357. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12231>.
13. Trubiano JA, Dennison AM, Morrissey CO, Chua KY, Halliday CL, Chen SC, Spelman D. 2016. Clinical utility of panfungal polymerase chain reaction for the diagnosis of invasive fungal disease: a single center experience. *Med Mycol* 54: 138-146. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myv092>.
14. Jordanides NE, Allan EK, McLintock LA, Copland M, Devaney M, Stewart K, Parker AN, Johnson PR, Holyoake TL, Jones BL. 2005. A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Bone Marrow Transplant* 35: 389-395. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1704768>.
15. Landlinger C, Preuner S, Baskova L, van GM, Hartwig NG, Dworzak M, Mann G, Attarbaschi A, Kager L, Peters C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, van den Heuvel-Eibrink MM, Lion T. 2010. Diagnosis of invasive fungal infections by a real-time panfungal PCR assay in immunocompromised pediatric patients. *Leukemia* 24: 2032-2038. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2010.209>.
16. Arancia S, Sandini S, De BF, Fortini D. 2011. Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69: 283-285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.003>.
17. Gago S, Zaragoza O, Cuesta I, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Buitrago MJ. 2011. High-resolution melting analysis for identification of the *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii* complex. *J Clin Microbiol* 49: 3663-3666. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01091-11>.
18. Ninghui G, Bing W, Wei R, Mengmeng L, Meiling C, Dongya M, Liqiong Y, Wencheng X. 2015. Application of PCR and High-Resolution Melting for Rapid Identification of Yeasts Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *Ann Clin Lab Sci* 45: 680-685.
19. Didehdar M, Khansarinejad B, Amirrajab N, Shokohi T. 2016. Development of a high-resolution melting analysis assay for rapid and high-throughput identification of clinically important dermatophyte

species. *Mycoses* 59: 442-449. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12492>.

20. Lengerova M, Racil Z, Hrcirova K, Kocmanova I, Volfova P, Ricna D, Bejdak P, Moulis M, Pavlovsky Z, Weinbergerova B, Toskova M, Mayer J. 2014. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 52: 2824-2828. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00637-14>.

21. Alonso M, Escribano P, Guinea J, Recio S, Simon A, Pelaez T, Bouza E, Garcia d, V. 2012. Rapid detection and identification of *Aspergillus* from lower respiratory tract specimens by use of a combined probe-high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol* 50: 3238-3243. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00176-12>.

22. White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. pp. 315-324. In Innis MA, Gelfand J, Sninsky J, White TJ (ed), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. San Diego, CA.

23. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE. 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: 1813-1821. <http://dx.doi.org/10.1086/588660>.

24. Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2014. Performance of panfungal- and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: a 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. *J Clin Microbiol* 52: 1737-1740. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00328-14>.

25. Badiie P, Kordbacheh P, Alborzi A, Malekhoseini S, Ramzi M, Mirhendi H, Mahmoodi

M, Shakiba E. 2009. Study on invasive fungal infections in immunocompromised patients to present a suitable early diagnostic procedure. *Int J Infect Dis* 13: 97-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2008.04.011>.

26. Halliday CL, Kidd SE, Sorrell TC, Chen SC. 2015. Molecular diagnostic methods for invasive fungal disease: the horizon draws nearer? *Pathology* 47: 257-269. <http://dx.doi.org/10.1097/PAT.0000000000000234>.

27. Lass-Flörl C, Mutschlechner W, Aigner M, Grif K, Marth C, Girschikofsky M, Grander W, Greil R, Russ G, Cerkl P, Eller M, Kropshofer G, Eschertzhuber S, Kathrein H, Schmid S, Beer R, Lorenz I, Theurl I, Nachbaur D. 2013. Utility of PCR in diagnosis of invasive fungal infections: real-life data from a multicenter study. *J Clin Microbiol* 51: 863-868. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02965-12>.

28. Sugawara Y, Nakase K, Nakamura A, Ohishi K, Sugimoto Y, Fujieda A, Monma F, Suzuki K, Masuya M, Matsushima Y, Wada H, Nobori T, Katayama N. 2013. Clinical utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders. *Eur J Haematol* 90: 331-339. <http://dx.doi.org/10.1111/ejh.12078>.

29. 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: 979-983.

30. Bezdicek M, Lengerova M, Ricna D, Weinbergerova B, Kocmanova I, Volfova P, Drgona L, Poczova M, Mayer J, Racil Z. 2016. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Med Mycol*. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myw032>.

31. Muñoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME, Gomez BL. 2010. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. *J Clin Microbiol* 48: 2147-2153. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00459-10>.

32. Kocjan BJ, Hosnjak L, Poljak M. 2015. Commercially available kits for manual and automatic extraction of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 24: 47-53. <http://dx.doi.org/10.15570/actaapa.2015.12>.

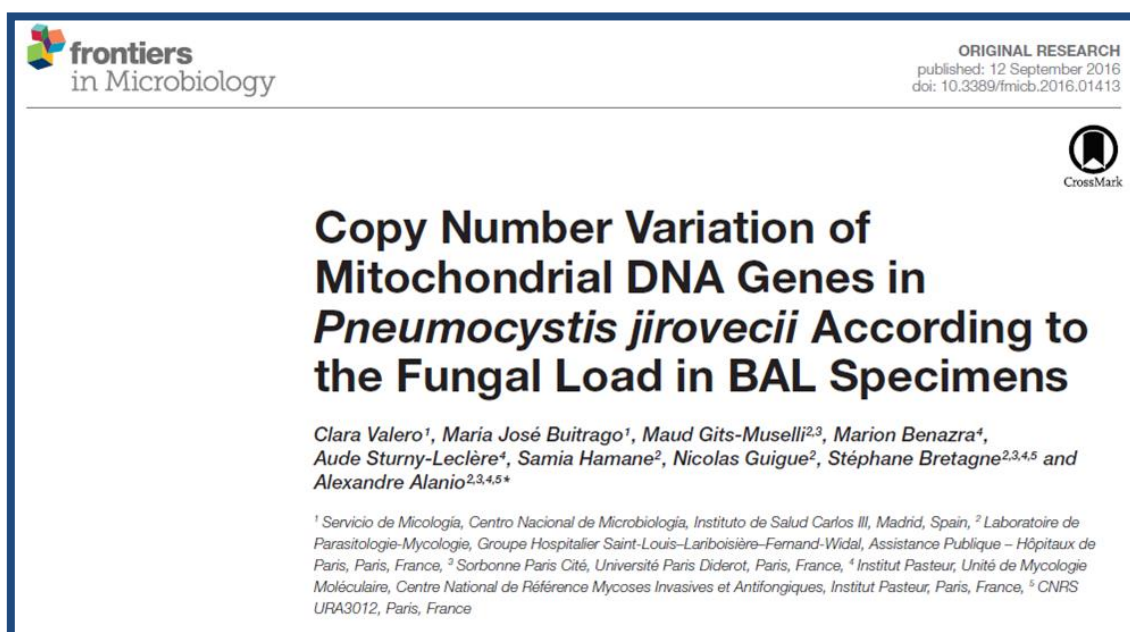


4. Objetivo segundo

MEJORA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA NEUMOCISTOSIS

Cuantificación de diferentes dianas mitocondriales de *P. jirovecii* respecto al genoma nuclear.

Publicación original: Valero C, Buitrago MJ, Gits-Muselli M, Benazra M, Sturny-Leclère A, Hamane S, Guigue N, Bretagne S, Alanio A. Copy number variation of mitochondrial DNA genes in *Pneumocystis jirovecii* according to the fungal load in BAL specimens. *Front Microbiol.* 2016, 7:1413. doi: 10.3389/fmicb.2016.01413.



Actualmente, la diferenciación entre colonización e infección activa por *P. jirovecii* se basa en la clínica del paciente, en los resultados de la técnica de IF y en el análisis de la carga fúngica de las muestras mediante cuantificación por qPCR. Sin embargo, con frecuencia, es muy difícil diferenciar las dos fases de la infección en base a estos criterios. En general, el diagnóstico molecular de la PCP está basado en la detección del gen mitocondrial que codifica para la subunidad grande del ribosoma mitocondrial (*mtLSU rRNA*), aunque la fisiología del hongo y el número de copias de los genes mitocondriales no se ha estudiado hasta la fecha.

Objetivo segundo

En este trabajo se calculó el número de copias relativo de cuatro genes mitocondriales (*mtLSU rRNA*, *mtSSU rRNA*, *NAD1* y *CYTb*) mediante qPCR y se emplearon dos dianas nucleares unicopia (*DHPS* y *HSP70*) para la normalización de los datos. Se analizaron un total de 84 muestras de LBA de pacientes con diferente enfermedad de base y en distintos estadios de la infección.

Los resultados mostraron que el número de copias de los cuatro genes difería considerablemente entre ellos, siendo el gen que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial (*mtSSU rRNA*) el más representado. También se observó que el número de copias de los cuatro genes fluctuaba dependiendo de la carga fúngica, siendo menor conforme disminuía la misma, con la excepción del gen *mtSSU rRNA*. Estas diferencias permitieron clasificar las muestras clínicas de los pacientes en cinco grupos, significativamente asociados con la carga fúngica.

La revisión de los datos de los pacientes sugiere que la qPCR sería el criterio más adecuado para la discriminación entre infección activa y colonización y, en concreto, se concluye que el gen *mtSSU rRNA* sería el mejor candidato para la cuantificación de *P. jirovecii* en muestras respiratorias humanas. Por último, los resultados obtenidos indican que podría existir una mezcla de varias “sub-especies” de ADNm con diferentes tasas de replicación según el estado fisiológico del hongo.

Copy number variation of mitochondrial DNA genes in *Pneumocystis jirovecii* according to the fungal load in BAL specimens

Valero C¹, Buitrago MJ¹, Gits-Muselli M^{2,3}, Benazra M⁴, Sturny-Leclère A⁴, Hamane S², Guigue N², Bretagne S^{2,3,4,5}, Alanio A^{2,3,4,5*}

¹Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid), Spain.

²Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Groupe Hospitalier Saint-Louis-Lariboisière-Fernand-Widal, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

³Sorbonne Paris Cité, Université Paris Diderot, Paris, France.

⁴Institut Pasteur, Unité de Mycologie Moléculaire, Centre National de Référence Mycoses Invasives et Antifongiques, Institut Pasteur, Paris, France, 5 CNRS URA3012, Paris, France.

*Corresponding author: Dr. Alexandre Alanio. e-mail: alexandre.alanio@pasteur.fr.

ABSTRACT

Pneumocystis jirovecii is an unculturable fungus and the causative agent of *Pneumocystis* pneumonia, a life-threatening opportunistic infection. Although molecular diagnosis is often based on the detection of *mtLSU rRNA* mitochondrial gene, the number of copies of mitochondrial genes had not been investigated. We developed and optimized six real-time PCR assays in order to determine the copy number of four mitochondrial genes (*mtSSU rRNA*, *mtLSU rRNA*, *NAD1*, and *CYTB*) in comparison to nuclear genome (*DHPS* and *HSP70*) and tested 84 bronchoalveolar fluids of patients at different stages of the infection. Unexpectedly, we found that copy number of mitochondrial genes varied from gene to gene with *mtSSU rRNA* gene being more represented (37 copies) than *NAD1* (23 copies), *mtLSU rRNA* (15 copies) and *CYTB* (6 copies) genes compared to nuclear genome. Hierarchical clustering analysis (HCA) allowed us to define five major clusters, significantly associated with fungal load ($p=0.029$), in which copy number of mitochondrial genes was significantly different among them. More importantly, copy number of *mtLSU rRNA*, *NAD1*, and *CYTB* but not *mtSSU rRNA* differed according to *P. jirovecii* physiological state with a decreased number of copies when the fungal load is low. This suggests the existence of a mixture of various subspecies of mtDNA that can harbor different amplification rates. Overall, we revealed here an unexpected variability of *P. jirovecii* mtDNA copy number that fluctuates according to *P. jirovecii*'s physiological state, except for *mtSSU* that is the most stable and the most present mitochondrial gene.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, real-time PCR, DNA quantification, PcP, carriage, mitochondria, copy number variation.

INTRODUCTION

Pneumocystis jirovecii is an ascomycetous fungus that is specifically associated to human lung microbiota (Cushion, 2010; Gigliotti and Wright, 2012). *P. jirovecii* thrives at the surface of alveolar pneumocytes in humans but fails to grow on artificial media. However, air-liquid interface culture system has been developed with demonstration of *P. jirovecii* amplification in vitro (Schildgen *et al.*, 2014). These characteristics have made difficult to study its genetic diversity, complexity and evolution in humans. In particular, the nuclear genome of *P. jirovecii* has only recently been sequenced (Cissé *et al.*, 2012; Cushion and Keely, 2013) and its mitochondrial genome recently described (Ma *et al.*, 2013). It is now well accepted that *P. jirovecii* circulates within normal hosts with interhuman transmission through air (Choukri *et al.*, 2010; Cushion, 2010; Gigliotti and Wright, 2012). Primary infection occurs very early in life with almost all infants being exposed to *P. jirovecii* before the age of 2 years based on serological surveys and detection of *P. jirovecii* DNA in healthy children (Vargas *et al.*, 2001; Bishop and Kovacs, 2003). The transmission of *P. jirovecii* to immunocompromised host in the absence of prophylaxis results in progressive increase of the fungal burden in lungs (Choukri *et al.*, 2011). Asymptomatic carriage or colonization as defined as detection of *P. jirovecii* DNA in asymptomatic patients is common in immunocompromised population representing about 15-20% of the patients (Alanio *et al.*, 2011; Morris and Norris, 2012; Mühlethaler *et al.*, 2012). If a carrier patient remains immunocompromised, *Pneumocystis* pneumonia (PCP) can occur within the following weeks (Mori *et al.*, 2009). Indeed, *P. jirovecii* is known to cause PCP, especially in patients with cellular immunosuppression such as HIV-positive, solid organ transplant and cancer/hematology

patients, but also in adults and children with other underlying conditions (Pagano *et al.*, 2002; Roblot *et al.*, 2003; Catherinot *et al.*, 2010; Wissmann *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 2011; Mori and Sugimoto, 2012; Tasaka and Tokuda, 2012). PCP symptoms have been described more severe and death rates have been considered significantly higher in HIV-negative in comparison to HIV-positive patients (Roux *et al.*, 2014).

Historically, the diagnosis of PCP relied only on the visualization of the fungal forms (trophic forms) and asci (cysts) using classical staining (Giemsa, Gomori methenamine silver, Toluidine Blue, Calcofluor) or direct or indirect immunofluorescence stainings (Alanio *et al.*, 2016b). These methods lack sensitivity and specificity and need microscopical expertise compared to PCR methods that have been developed since the 1990's (Wakefield *et al.*, 1990). In the past 15 years, *P. jirovecii* DNA amplification assays have emerged as new diagnostic tools for PCP diagnosis especially when real-time quantitative PCR (RT-PCR) has been used as the most reliable method for diagnostic PCR assays (Alanio *et al.*, 2016b). Quantitative results are of prime interest since carrier patients can be detected for *P. jirovecii* DNA as patients with PCP. Indeed, thresholds with a gray zone have been proposed to classify patients in terms of probability of having PCP (Flori *et al.*, 2004; Alanio *et al.*, 2011; Mühlethaler *et al.*, 2012). To increase sensitivity, repeated targets have been selected with the mitochondrial large ribosomal subunit (*mtLSU rRNA*) as the main target used in diagnostic assay. It has been observed by using electron microscopy that each trophic form carried one mitochondria but the number of mitochondrial DNA (mtDNA) copies per organism have not been clearly investigated. According to some reports, mtDNA of *P. jirovecii* may have circular configuration in contrast to closely related species *P. carini* and

P. murina, in which mtDNA has a linear conformation. Despite this change in configuration, all species share the same set of genes but in a different ordering (Ma *et al.*, 2013). However, the physiology of the mitochondria in *P. jirovecii* is mostly unknown, which makes difficult to rely *P. jirovecii* quantification only on mitochondrial genes. The aim of this study was to analyze the quantification of four mitochondrial genes located in different places of the mitochondrial genome in comparison to two nuclear unique genes in respiratory samples of patients harboring various clinical situations.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Saint-Louis Hospital, Paris, France, is a 650-bed tertiary university hospital with main clinical activities in hematology and oncology. This study was a retrospective non-interventional study. Biological material and clinical data were obtained only for standard diagnostic procedures following physicians' prescriptions with no specific sampling. According to the French Health Public Law (CSP Art L1121-1.1), such study did not require approval of an ethics committee and is exempted from specific informed consent application.

Patients and clinical samples

All *P. jirovecii* PCR positive clinical samples containing more than 10 trophic form equivalents/mL, according to the quantification method based on the qPCR assay proposed by Alanio *et al.* (2011), were selected for this study. These samples were collected from patients managed in Saint-Louis Hospital, Paris, France, and processed and stored at -20 °C in our laboratory. DNA extraction of the clinical samples was performed by using a QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Hilden, Germany),

according to the manufacturer's instructions as already described (Alanio *et al.*, 2011).

A total of 86 bronchoalveolar lavage (BAL) fluids from 84 patients were selected. Clinical (background of the patient, the final diagnosis of the infectious episode) and biological (immunofluorescence results, PCR quantification) parameters were collected retrospectively from electronic patient files and from our biological data management software, respectively. For all analysis, only the first sample per patient was considered in the analysis to avoid redundancy in the data. A second cohort of 95 *mtLSUrRNA* PCR-negative samples from the routine testing data was tested for the presence of *mtSSU rRNA* amplification.

Real-time quantitative PCR assays

Primers and probes were designed to amplify six different *loci* of *P. jirovecii* genome using Primer3web v4.0.0 software. Four of them (*mtSSU rRNA*, *mtLSU rRNA*, *NAD1*, and *CYTB*) were mitochondrial genes, and two (*DHPS* and *HSP70*) were unique nuclear genes. Sequences of primers and probes used in this study and the size of the amplicon generated, are detailed in [Table S1](#).

RT-PCR assays were carried out in a LightCycler 480 unit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). PCR reactions were performed in 25µl-final volume containing 0.3mM of each pair of primers and 0.1mM of probe for each target tested in the assay. For *mtLSU*, *DHPS*, *NAD1*, and *mtSSU* quantification assays, 2x LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was used, whereas 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was added for *CYTB* and *HSP70* quantification analysis. Finally, 5µl of DNA extracted from clinical samples were added in duplicate to each quantification assay. PCR conditions were

Objetivo segundo

as follows: an initial step of 10min at 95 °C, following by 45 cycles at 95 °C for 15s and 60 °C for 30s with an ending cooling phase of 30s at 40 °C. Results were considered positive when the fluorescent signal above the baseline was detected, as determined by second-derivate analysis and were expressed in terms of the quantification cycle (Cq). Each experiment included a positive control consisted in a dilution of DNA extracted from a controlled clinical sample positive for PCP at high fungal load as well as negative controls.

Standardization and data analysis

A standard curve for each genomic target allowing PCR efficiency calculation was obtained based on the result of two PCR repetitions with five 10-fold serial dilutions of a controlled DNA extracted from a clinical sample positive for PCP at high fungal load and previously quantified by RT-PCR (Alanio *et al.*, 2011). Regression lines were constructed automatically by plotting the logarithm of the initial template concentration versus the corresponding Cq value by using Analysis package included in LightCycler 480 software v.1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). For the calculation of the copy number, the minimal Cq value obtained was selected from the duplicate values. The Cq ratio between each mitochondrial gene and the geometric mean of the two monocopy nuclear genes was calculated as described by Pfaffl (2001) and Vandesompele *et al.* (2002). The geometric mean of two monocopy nuclear genes was considered as the best value representing the nuclear genome and called “nuclear genes” along the manuscript.

Finally, a specificity test was performed by testing a panel of different fungal DNAs at 0.01ng/mL for each target analyzed in this work. DNAs tested belonged to fungal species present, normally, in the human respiratory tract: *Aspergillus fumigatus* Af293, *A. niger*

CNRMA15.743, *Rhizopus microsporus*
CNRMA14.351, *Mucor circinelloides*
CNRMA16.241, *Candida albicans*
CNRMA16.291, *C. glabrata* CNRMA16.324,
Cryptococcus neoformans CNRMA16.024,
Trichosporon asahii CBS2479, *Malassezia furfur*
CNRMA15.762, identified at the French National Reference Center for Invasive Mycoses and Antifungals.

Statistical and graph analysis

Physical mapping of the *P. jirovecii* mitochondrial DNA was generated in Geneious software v.8.1.5. based on the JX499143 sequence provided by Ma *et al.* (2013). Box-and-whisker plots with minimum-maximum were used for data representation. For comparisons, we performed unpaired *t*-test and ANOVA analysis for normally distributed data and Mann–Whitney and Kruskal-Wallis tests for data that were not normally distributed, and χ^2 test and Fisher’s exact test for contingency tables analyses. Median and interquartile ranges are described in the text. *P*-values of <0.05 were considered significant and the *p*-value was indicated by asterisks as follows: **p*≤0.05, ***p*≤0.01, ****p*≤0.001, *****p*≤0.0001. Both graphs and statistical analysis were performed by using Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Hierarchical clustering analysis (HCA) of samples was performed by using TIGR Multiexperiment Viewer (MeV) software v4.6.1 software v4.6.1 (Saeed *et al.*, 2003).

RESULTS

Six real-time quantitative PCR assays for determining mitochondrial DNA copy number variation (CNV)

Copy number of mitochondrial genes (*mtLSU*, *mtSSU*, *NAD1*, and *CYTB*, Fig. S1) was calculated using qPCR. All the six qPCR assays were optimized (Fig. S2-S4). A positive control DNA

stored at -20°C as $12\mu\text{L}$ aliquots was run to validate each run. PCR efficiencies calculated based on 10-fold serial dilutions of the positive control DNA were as follows: *mtLSU rRNA*, $E=1.938$; *CYTB*, $E=1.97$; *NAD1*, $E=1.968$; *mtSSU rRNA*, $E=1.931$; *DHPS*, $E=1.932$ and *HSP70*, $E=1.95$ (Fig. S5). Minimum Cq results of the six genes were used to calculate the ratio between each mitochondrial gene and the geometric mean of the two nuclear genes. The

mean Cq value of the positive control DNA included in each PCR assay was 29.18 ± 0.3 for *mtSSU rRNA*, 30.30 ± 0.28 for *mtLSU rRNA*, 29.16 ± 0.16 for *NAD1*, 30.87 ± 0.36 for *CYTB*, 34.69 ± 0.43 for *DHPS* and 35.98 ± 0.58 for *HSP70*. In order to evaluate the specificity of the assay, DNAs belonging to nine different fungal species were tested for all genes studied in this work. No cross-reactivity to any of the tested fungi was detected.

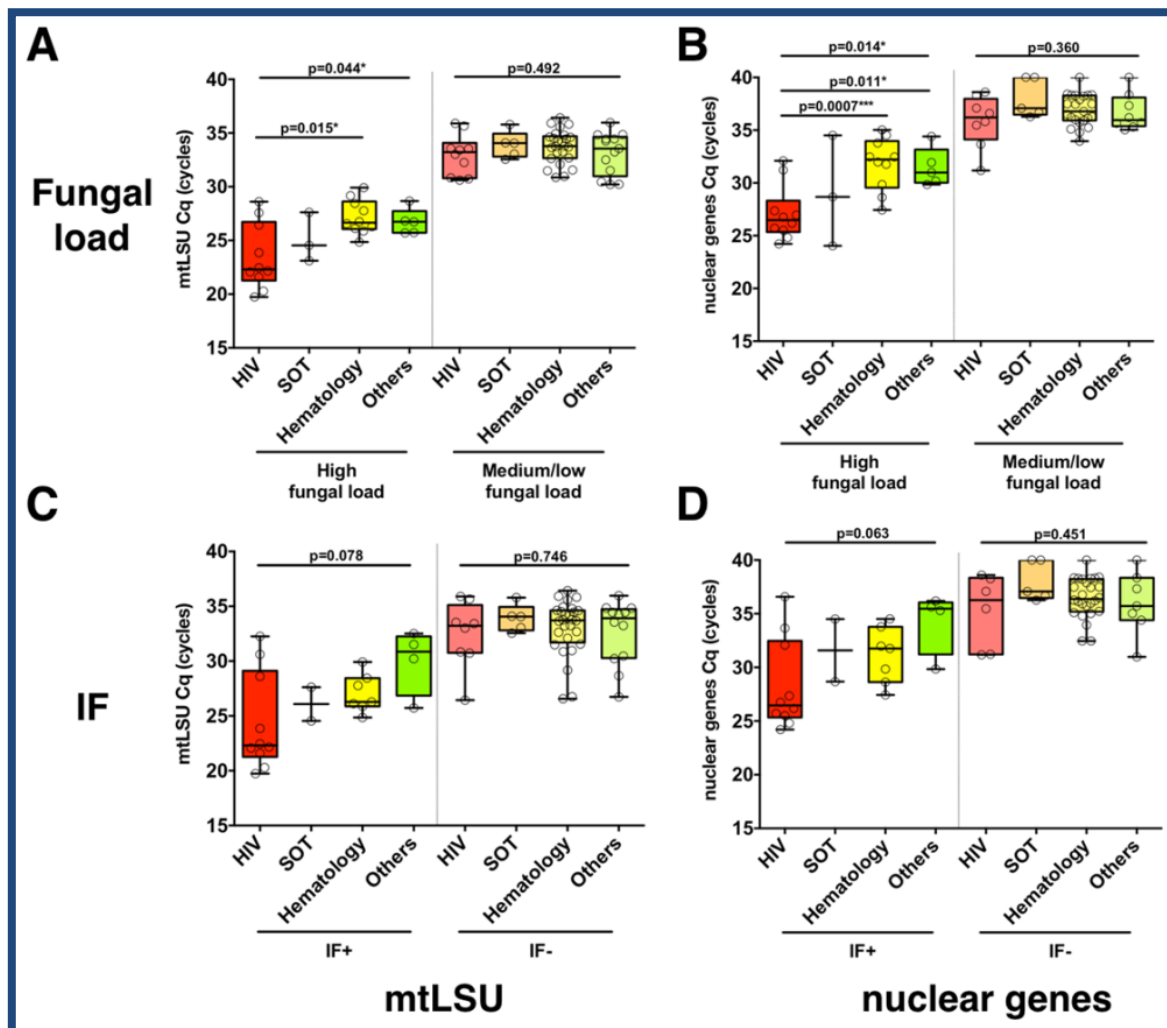


Fig. 1. *Pneumocystis jirovecii* fungal load varies according to the clinical background of the patients. A), B) The distribution of *P. jirovecii* quantification in bronchoalveolar lavage fluid (BAL) of patients with different clinical background (HIV positive patients, solid organ transplant patients or other background) is shown for high or medium/low fungal loads or C), D) for immunofluorescence (IF)-positive or -negative BAL, as quantified using A), C) *mtLSU rRNA* gene or B), D) nuclear genes. *p*-values indicating the significance of the differences are indicated in the top of the figure for each category.

The *P. jirovecii* fungal load does not reflect the results of immunofluorescence and the final clinical diagnosis.

According to clinical sample selection criteria explained in section “Materials and Methods” (see Patients and clinical samples), 84 BAL fluids were finally included in the study. The median age of patients was 61 years and the male:female ratio was 1.6:1. Clinical and biological parameters are summarized in **Table 1**.

In BAL samples with high fungal load, the load was significantly different regarding the background of the patient (HIV, SOT, hematology, others), as determined from *mtLSU rRNA* ($p=0.044$) and from nuclear genes ($p=0.014$) quantification with significant differences between HIV and hematology patients (*mtLSU Cq*, $p=0.0015$; nuclear genes *Cq*, $p=0.0007$) and HIV and other backgrounds (nuclear genes, $p=0.011$) (**Fig. 1A, B**), but not with *NAD1* or *CYTB* (**Fig. S6A, B**). In samples with medium or low fungal load, no differences were observed between the different clinical backgrounds ($p>0.05$). In contrast, no significant difference ($p>0.05$) was observed between the different clinical backgrounds in immunofluorescence positive or negative BAL samples for *mtLSU rRNA* (**Fig. 1C**) or nuclear genes (**Fig. 1D**). The same feature was observed for the final diagnosis classification (PCP vs. PCC) (**Fig. S6C, D**).

A large overlap of BAL fungal load is observed regarding the results of immunofluorescence in all six genes with 34-54% of the samples included between the last IF+ and the first IF- sample, as highlighted in color (**Fig. 2A**). In addition, the BAL fungal load as determined by *mtLSU rRNA Cq* was plotted regarding the result of immunofluorescence and the final diagnosis retained by the clinicians (**Fig. 2B**). Large overlaps between PCP and PCC patients are observed in each category either in HIV+ patients (**Fig. 2C**) or in HIV-patients (**Fig. 2D**) preventing determination of absolute thresholds.

Table 1. Main clinical and biological characteristics of the patients and samples (n=84) included in the study.

	Number of samples (n=84)	<i>mtLSU Cq</i> (mean±SD)
Clinical characteristics		
Underlying disease		
HIV	20	/
Kidney SOT	8	/
Hematology disease	35	/
Others	18	/
na	3	/
Final clinical diagnosis		
PCP	44	28.42±4.24
PCC	34	33.75±2.18
na	6	30.87±3.48
Biological characteristics		
Fungal load		
High (Cq<30)	29	25.60±2.69
Medium (30<Cq>34)	31	32.29±1.20
Low (Cq>34)	24	35.00±0.72
IF assay		
IF+	24	26.33±3.76
IF-	54	33.01±2.56
na	6	28.13±3.94

HIV: human immunodeficiency virus; **SOT:** solid organ transplant; **PCP:** *Pneumocystis pneumonia*; **PCC:** *Pneumocystis carriage*; **IF:** immunofluorescence; **na:** non-available data.

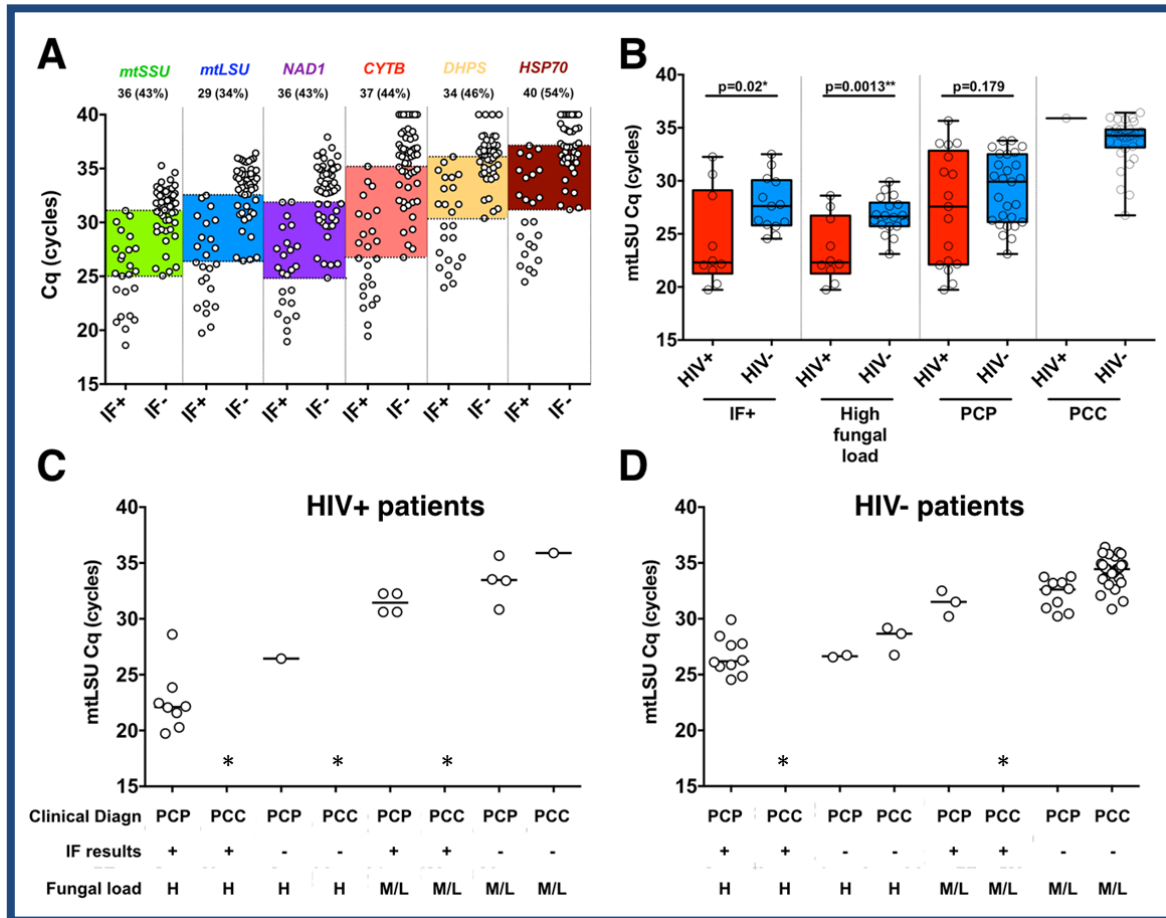


Fig. 2. Immunofluorescence assay and final clinical diagnosis does not reflect *P. jirovecii* fungal load in BAL samples. **A)** Quantification of the six genes included in the study regarding immunofluorescence results of clinical samples. Large overlaps between the low IF+ sample and the higher IF- samples are highlighted with color boxes. The number and percentages of samples included in those overlaps are detailed in the top of the figure for each gene. **B)** *mtLSU rRNA* gene quantification in HIV+ and HIV- patients for immunofluorescence-positive, high fungal load and final clinical diagnosis. **C)** *mtLSU rRNA* gene quantification regarding final clinical diagnosis, immunofluorescence results and fungal load in HIV positive patients and **D)** HIV negative patients. * indicates that this situation was not present in our dataset.

Mitochondrial genes harbor different copy numbers, which vary according to the fungal load

The median number of copies of the four mitochondrial genes varies compared to nuclear genome with *mtSSU*, *mtLSU*, *NAD1*, and *CYTB* harboring a median copy number of 37 (interquartile range, 23-64), 15 (8-25), 23 (12-39), 6 (2-11), compared to the geometric mean of *DHFR*, *HSP70* (nuclear genome), respectively (Fig. 3A). Hierarchical clustering analysis of 74 of the 84 BALs based on the variation of copy number of mitochondrial genes from the

median value allowed us to define five major clusters (≥ 6 samples per cluster): cluster1 (n=8), cluster 3 (n=11), cluster 4 (n=6), cluster 6 (n=23) and cluster 7 (n=23) (Fig. 3B). Of note, mitochondrial CNV was not calculable for the 10 BALs for which no amplification of the nuclear genes (*DHPS* and *HSP70*) was observed. CNV of all mitochondrial genes were statistically different among all clusters described. However, the difference between the number of copies of the four genes is less important in the 23 samples from cluster 7 (C7) (Fig. 3C). These five clusters were significantly

Objetivo segundo

associated with the fungal load (high vs. medium/low, $p=0.029$) but not with immunofluorescence (IF+ vs. IF-, $p=0.11$) or clinical status (PCP vs. PCC, $p=0.137$) (**Table 2**).

In details, C1 was significantly associated with medium/low fungal load (0% vs. 18.2%, $p=0.020$).

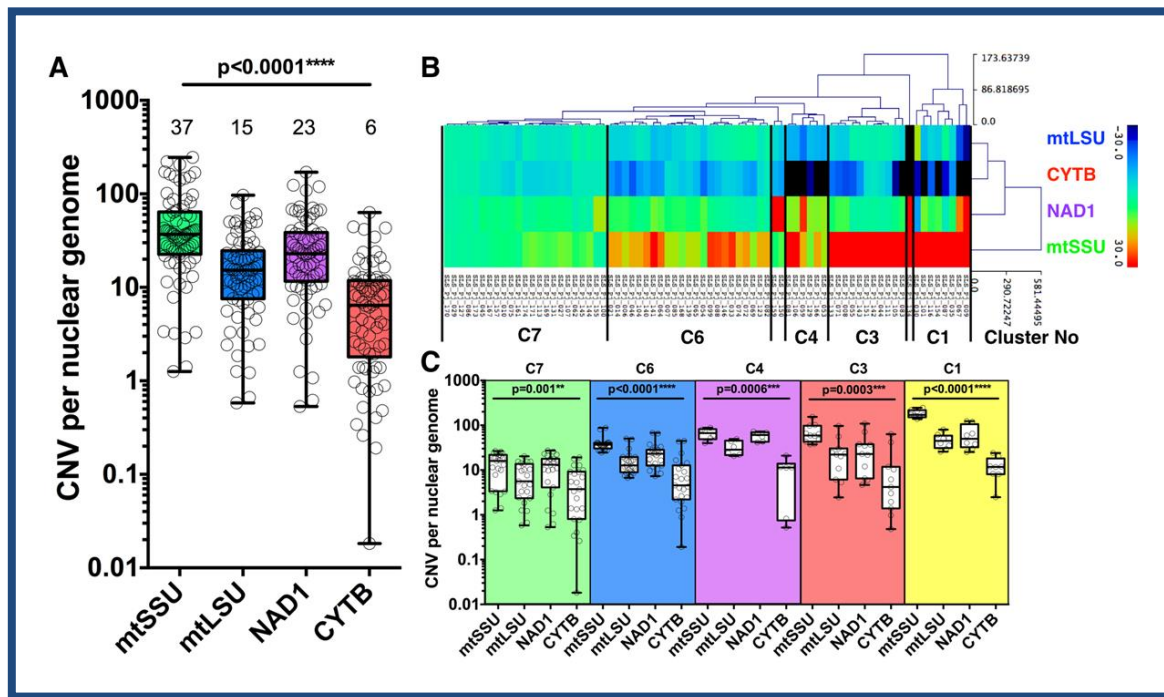


Fig. 3. Copy number variation of four mitochondrial genes. **A)** Copy number variation (CNV) of *P. jirovecii* mitochondrial genes varies from gene to gene with a median of six copies for *CYTB*, 23 for *NAD1*, 15 for *mtLSU*, and 37 for *mtSSU* compared to the mean of two nuclear genes (*DHPS* and *HSP70*). Median copy number is indicated in the top of the figure for each target. **B)** Heat map of the copy number of the four mitochondrial genes of the 74 BALs as the result of hierarchical clustering analysis (HCA). Five major clusters containing ≥ 6 samples were defined as indicated between bars with **C)** the detailed quantification of each gene within each cluster. p -values indicating the significance of the differences between each gene in a given cluster are indicated in the top of the figure for each category.

Table 2. Distribution of the samples according to the hierarchical clustering algorithm (HCA) clusters and the fungal load, immunofluorescence or final clinical diagnosis.

	HCA clusters					p^*
	C1	C3	C4	C6	C7	
High fungal load (%) n=27	0 (0)	2 (7.4)	4 (14.8)	9 (33.3)	12 (44.4)	0.029
Medium/low fungal load (%) n=44	8 (18.2)	9 (20.4)	2 (4.5)	14 (31.8)	11 (25)	
IF+ (%) n=23	1 (4.3)	2 (8.7)	2 (8.7)	7 (30.4)	11 (47.8)	0.111
IF- (%) n=42	7 (16.6)	9 (21.4)	4 (9.5)	14 (33.3)	8 (19)	
PCP (%) n=41	2 (4.9)	4 (12.2)	4 (9.8)	13 (34.14)	16 (39)	0.137
PCC (%) n=26	6 (23.1)	5 (19.23)	1 (3.8)	8 (30.8)	6 (23.1)	

*Chi-2 test

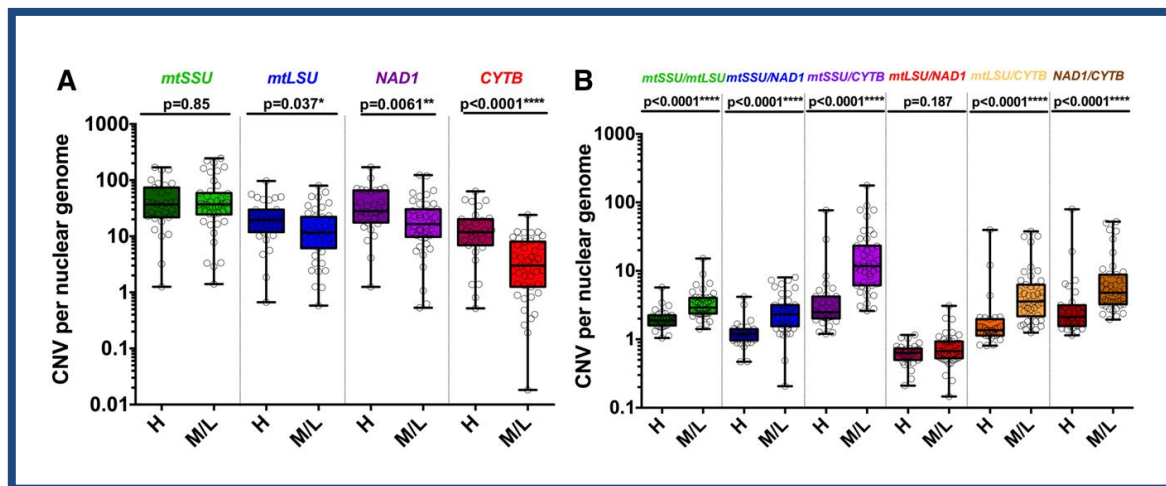


Fig. 4. Copy number variation of mitochondrial genes varies according to the fungal load. **A)** CNV is significantly different in samples with high and medium/low fungal loads for *mtLSU*, *CYT B* and *NAD1* but not for *mtSSU*. **B)** Each ratio of the DNA of the four mitochondrial genes is significantly different in samples with high and medium/low fungal loads except *mtLSU/NAD1*. *p*-values indicating the significance of the differences are indicated in the top of the figure for each category.

Significant differences in the CNV between high and medium/low fungal loads were observed for *mtLSU* ($p=0.037$), *NAD1* ($p=0.0061$), and *CYT B* ($p<0.0001$) (Fig. 4A). The ratio of these genes between high and medium/low fungal loads were significantly different ($p<0.0001$), except for the *mtLSU/NAD1* ratio ($p=0.187$) (Fig. 4B). The CNV of *NAD1* and *CYT B* and all the ratios were still significantly different when three categories of fungal load were taken into account (high vs. medium vs. low, Fig. S7A, B). Differences for the *CYT B* gene (Fig. S8A, C) and all ratios regarding IF results and final clinical diagnosis were significant ($p<0.05$) except for the *mtLSU/NAD1* ratio regarding IF results (Fig. S8B, D).

***mtSSU* rRNA target is detected in *mtLSU* rRNA negative samples**

Since *mtSSU* rRNA was demonstrated to be present with a higher number of copies compared to *mtLSU* rRNA, with a 2.5 times more quantification compared to *mtLSU* rRNA (37/15 copies; Fig. 3A), we tested a second cohort of negative-*mtLSU* rRNA PCR samples for *mtSSU* rRNA amplification. Three samples (two patients) out of 95 were positive for

mtSSU rRNA amplification. Two of them were a bronchial aspirate (Cq: 34.69) and a BAL fluid (Cq: 33.50) both for the same patient, whereas the remaining one was a induced-sputum (Cq: 33.13) for a patient with a BAL positive for *mtLSU* rRNA amplification but with less than 10 trophic form equivalents/mL (4.5 TFEq/mL). These patients were given anti-*P. jirovecii* prophylaxis after the clinical episode and did not develop PCP within the next 2 years.

DISCUSSION

PCR assays are now considered as the most useful tool for pneumocystosis diagnosis, especially in HIV-negative immunocompromised patients, with an excellent negative predictive value and a high level of suspicion when PCR is positive (Alanio *et al.*, 2016b). The most commonly used PCR assay is based on the amplification of mitochondrial large subunit ribosomal gene (*mtLSU* rRNA). This target has been proposed and used for 25 years (Wakefield *et al.*, 1990; Meliani *et al.*, 2003; Aderaye *et al.*, 2008; Alanio *et al.*, 2011; Hauser *et al.*, 2011; Botterel *et al.*, 2012). Multicopy genes have been shown to lead to

increased detection of *P. jirovecii*. Indeed, *mtLSU* (Montesinos *et al.*, 2015) and *MSG* (Linssen *et al.*, 2006) PCR assays gave increased sensitivity compared to unicopy genes (*DHPS* or *β -tubulin*). However, strict comparison of *mtLSU* and unique gene PCR assays had not been performed until now. In our study, we designed and optimized six PCR assays including four mitochondrial genes assays (*mtLSU* (Alanio *et al.*, 2011), *mtSSU*, *NAD1*, and *CYTb*) and two unique nuclear gene assays (*DHPS*, *HSP70*), with the initial idea to evaluate the number of mitochondrial DNA copies compared to nuclear unique genes. Primer concentration, buffer from different suppliers, and PCR cycles protocols were optimized (see Fig. S2-S5) and efficiencies calculated to allow accurate copy number calculations following accurate calculations. We then screened a collection of 84 BALs selected to harbor more than 10 EqTr/ml using *mtLSU* PCR assay to increase the chance to get amplification for nuclear unique genes.

The result of the immunofluorescence (IF) assay (positive vs. negative), the PCR fungal load (high vs. medium/low) and the final clinical diagnosis of the episode based on electronic file of the patient's episode (pneumocystosis (PCP) vs. carriage (PCC)) were first analyzed regarding that of our six PCR assays. As observed before in literature (Mühlethaler *et al.*, 2012), we observed a large overlap in terms of fungal load between IF+ and IF- samples suggesting that the result of the IF assay does not reflect perfectly the fungal load in respiratory samples. This can be explained by intrinsic technical issues of IF assay (limited amount of material spotted on slices, variability of the quality of the samples, restriction at ≥ 3 elements for positive results according to manufacturer's recommendations, non-specificity of the shape of the acsi compared to yeasts). Another explanation is given by the potential differences in the trophic forms/asci

ratio known as about 1:10 in HIV positive patients with PCP and also known to vary upon drug exposure (Tamburrini *et al.*, 1996). If the generation of acsi is impaired for some reason, PCR assays will detect more DNA from trophic forms than from the acsi that would have been missed by the IF assay. This could explain why in our BAL samples about 34-54% of the samples were included in the overlap between the first IF- and the last IF+ samples.

We also found that the final clinical diagnosis as retained by the clinician was not linked to the fungal load. Indeed, we found patients harboring the same fungal load classified as PCP or PCC. No significant difference was observed between fungal loads of PCP patients between HIV+ and HIV- patients although differences were significant when fungal load or IF was considered, which is consistent with literature (Alanio *et al.*, 2011; Botterel *et al.*, 2012; Louis *et al.*, 2015). It is interesting to consider that the clinical decision is not based only on the result of biological tests but include also a broader view including pretest probability, radiological findings, background of the patient, initial evolution, occurrence of co-pathogens, experience of the clinician (Islam *et al.*, 2015). Indeed, four out of five HIV+ patients with CD4 counts $< 200/\text{mm}^3$ were classified as PCP with IF- and a medium/low fungal load. This clinical decision is coherent with the fact that *P. jirovecii* found in an immuno-compromised host even with a medium or low fungal load should be considered carefully in terms of treatment, as recommended in non-HIV immuno-compromised patients (Alanio *et al.*, 2016b). Given these observations, it appears that the fungal load would be the most objective criteria for further analysis that prevent any bias due to technical or clinical interpretation.

Using our assays, we observed intriguingly that the number of copies for four mitochondrial genes was different in all the 84 samples,

although for the 23 samples from cluster 7, the difference was significant but less noticeable (Fig. 3B, C). Mitochondrial DNA (mtDNA) is supposed to be circular in *P. jirovecii* as opposed to *P. carinii* or *P. murina* for which a linear structure have been proposed (Ma *et al.*, 2013) and so, each gene is supposed to be present once per mtDNA copies and harboring the same number of copies compared to nuclear genes. Interestingly, *mtLSU rRNA* (median of 15 copies per nuclear genome) and *CYTB* (median of 6 copies per nuclear genome) assays gave less copy number than *NAD1* (median of 23copies per nuclear genome) or *mtSSU rRNA* (median of 37 copies per nuclear genome).

Our hypothesis is that in *P. jirovecii*, several mtDNA 'species' coexists with some of them

amplified more than others (Fig. 5). This is supported by the fact that the physical mapping of the mitochondrial genes (Fig. S1 (Ma *et al.*, 2013)) showed that *NAD1* and *mtSSU rRNA* are closer together than with the other genes. Indeed, one can imagine that a mtDNA subspecies including *NAD1* and *mtSSU rRNA* could be overrepresented compared to other subspecies and compared to the whole mtDNA. The technique used to describe the sequence of *P. jirovecii* was Sanger sequencing from conserved mtDNA regions of *P. murina* and *P. carinii* after cloning and endpoint PCR (Ma *et al.*, 2013). Indeed, this method does not accurately detect subspecies of mtDNA but is accurate to determine the synteny of mitochondrial genes when at least one entire copy of the mtDNA is present in the sample.

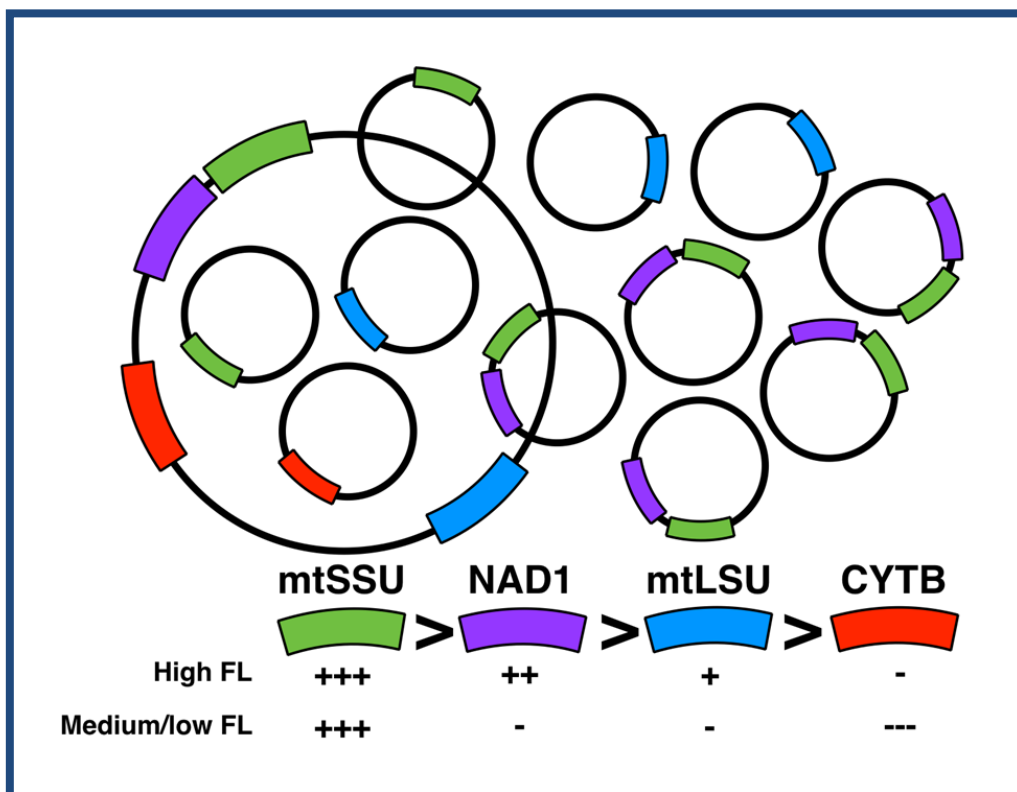


Fig. 5. Model for the dynamics of *P. jirovecii* mtDNA. High number of mtDNA subspecies are found together with the whole mtDNA species with variation of different subspecies according to the physiology of *P. jirovecii* (fungal load). A subspecies containing *mtSSU* and *NAD1* is present with a higher copy number compared to other mtDNA subspecies.

This observation needs to be analyzed in parallel with another observation we did recently using other samples on mitochondrial heteroplasmy and mtDNA recombination in *P. jirovecii* (Alanio *et al.*, 2016a). Unfortunately, we were not able to validate this hypothesis using endpoint PCR. This can be explained by the fact that large PCR amplicons (>2kbp) are difficult to obtain in complex DNA extracts as BAL fluids or by the fact that these subspecies are linear preventing amplification of the remaining DNA part that could have been amplified if it is circular.

Interestingly, we found that the number of copies of the different genes vary regarding the fungal load with discrimination between high, medium and low fungal loads. This supports the hypothesis of differential amplification of some subspecies of mtDNA regarding the metabolism state of *P. jirovecii*. A high fungal load would be related to highly proliferating organisms whereas medium/low fungal loads to a less proliferating or a more quiescent state. One can imagine that the physiology of mitochondria would be different in these two situations as already suggested in *Cryptococcus neoformans* (Alanio *et al.*, 2015; Rocheteau *et al.*, 2015) with the differential amplification of some subspecies in these different biological situations, as observed in our study.

In humans, deletion of mitochondrial genes, described as mtDNA depletion syndromes, leads to severe diseases with poor prognosis by impaired energy production affecting different organs like brain, muscles, liver and digestive tract (El-Hattab and Scaglia, 2013). However, for *P. jirovecii*, alteration of mitochondrial metabolism should not lead to such extremity, due to its adaptation to host parasitism at the surface of the human alveoli. *P. jirovecii* has been shown to uptake from host several factors it is unable to synthesize and the proteins involved in mitochondrial metabolisms should be one of these factors (Ma *et al.*,

2016). Indeed, *P. jirovecii* has lost synthetic pathways such as coenzyme A, thiamine, Glyoxylate, gluconeogenesis and fermentation, pathways in which mitochondria plays a role, with uptake from lung as a mean to obtain these metabolites (Ma *et al.*, 2016).

We also found that *mtSSU rRNA* is constantly present with a higher number of copies compared to *mtLSU rRNA* with a median ratio of 2.5 copies. This finding suggests that *mtSSU rRNA* could be present twice in the *P. jirovecii* mtDNA. In addition, *mtSSU rRNA* was demonstrated to be a more sensitive target to detect *P. jirovecii* in respiratory samples since some *mtLSU* negative/*mtSSU* positive samples were found in our collection. This is of prime importance since immuno-compromised patients with a positive *P. jirovecii* PCR in respiratory samples would benefit from a prophylactic treatment since detection of *P. jirovecii* at low fungal load could be the first step before the development of pneumocystosis (Mori *et al.*, 2009). Interestingly, *mtSSU rRNA* is the most stable mitochondrial marker regarding fungal load, immunofluorescence results or final clinical diagnosis. All these data suggest that *mtSSU* PCR assay is the best PCR assay to detect *P. jirovecii* in humans.

To conclude, further studies on *P. jirovecii* mitochondria are highly needed to validate our hypothesis suggesting plasticity of *P. jirovecii* mitochondrial genome (increased or decreased copy number) and to validate hypotheses from our previous work suggesting heteroplasmy and mtDNA recombination (Alanio *et al.*, 2016a), but its unculturable feature prevents the easy implementation of such studies.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Fig. S1. Genetic map of *Pneumocystis jirovecii* mtDNA based on JX499143 sequence is shown in linear configuration. *mtSSU rRNA*, *mtLSU rRNA*,

NAD1, and *CYTB* genes are shown emphasized within the figure.

Fig. S2. Optimization of qPCR assays I. *mtLSU rRNA* gene (top of the figure) was tested with Roche mastermix (LightCycler 480 Probes Master, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 0.3mM of each primer and 0.1mM of probe (top left panel), 0.5mM of each primer and 0.25mM of probe (top right panel), 0.6mM of each primer and 0.3mM of probe (lower left panel) and 0.3mM of each primer and 0.1mM of probe again but with Applied mastermix (TaqMan Universal PCR MasterMix, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) (lower right panel). *mtSSU rRNA* gene (beneath of the figure) was tested with 0.3mM of each primer and 0.1mM of probe with Roche (left panel) and Applied (right panel) mastermixes. Cq values obtained for each dilution of positive control DNA as well as efficiency calculated with those data are represented in a table next to the panels. Optimal PCR conditions are highlighted in color.

Fig. S3. Optimization of qPCR assays II. *CYTB* gene (top of the figure) was optimized by testing Roche mastermix with 0.3mM of each primer and 0.1mM of probe (top left panel), 0.5mM of each primer and 0.25mM of probe (top right panel), 0.6mM of each primer and 0.3mM of probe (lower left panel) and 0.3mM of each primer and 0.1mM of probe again but with Applied mastermix (lower right panel). *NAD1* gene (beneath of the figure) was tested with 0.3mM of each primer and 0.1mM of probe with Roche (left panel) and Applied (right panel) mastermixes. Cq values obtained for each dilution of positive control DNA as well as efficiency calculated with those data are represented in a table next to the panels. Optimal PCR conditions are highlighted in color.

Fig. S4. Optimization of qPCR assays III. *DHPS* gene (top of the figure) was optimized by testing Roche mastermix with 0.3mM of each primer and 0.1mM of probe (top left panel), 0.5mM of each primer and 0.25mM of probe (top right panel), 0.6mM of each primer and 0.3mM of probe (lower left panel) and

0.3mM of each primer and 0.1mM of probe again but with Applied mastermix (lower right panel). *HSP70* gene (beneath of the figure) was tested with 0.3mM of each primer and 0.1mM of probe with Roche (left panel) and Applied (right panel) mastermixes. Cq values obtained for each dilution of positive control DNA as well as efficiency calculated with those data are represented in a table next to the panels. Optimal PCR conditions are highlighted in color.

Fig. S5. Optimization of qPCR assays IV. Optimal PCR conditions are shown at once.

Fig. S6. *Pneumocystis jirovecii* quantification regarding clinical background of patients. **A)** *NAD1* quantification in high fungal load samples (left) and medium/low fungal load (right). **B)** *CYTB* quantification in high fungal load samples (left) and medium/low fungal load (right). **C)** *mtLSU rRNA* quantification in PCP samples (left) and PCC (right). **D)** Nuclear genes quantification in PCP samples (left) and PCC samples (right).

Fig. S7. Copy number variation of mitochondrial genes varies according to the fungal load. **A)** CNV is significantly different in samples with high, medium and low fungal loads for *CYTB* and *NAD1* but not for *mtLSU* or *mtSSU*. **B)** All ratio of the DNA of the four mitochondrial genes is significantly different in samples with high medium or low fungal loads. *P*-values indicating the significance of the differences are indicated in the top of the figure for each category.

Fig. S8. Copy number variation of mitochondrial genes do not vary according to immunofluorescence results and final clinical diagnosis. **A)** CNV of mitochondrial genes in IF+ and IF- samples. **B)** CNV in ratios between these mitochondrial genes in IF+ and IF- samples. **C)** CNV of mitochondrial gene in PCP and PCC samples. **D)** CNV in ratios between these mitochondrial genes in PCP and PCC samples. *P*-values indicating the significance of the differences are indicated in the top of the figure for each category.

Table S1. Sequences and targets of primers and probes used in *P.jirovecii* quantification assays and their corresponding amplicon sizes.

FUNDING

This work was supported by research project PI14CIII/00045 from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Instituto de Salud Carlos III.

CV is supported by research fellowship from the Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FI12/00095).

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the members of the parasitology-mycology laboratory and Dr. Jean Menotti for their participation in the routine detection of *P. jirovecii* in patients. We thank all the physicians involved in the collection of samples and patient care at Saint-Louis Hospital (Prof. Anne Bergeron, Prof. Marie Noelle Péraldi, Prof. Elie Azoulay, Prof. Jean-Michel Molina, Dr. Nathalie de Castro and Dr. Blandine Denis).

REFERENCES

Aderaye, G., Woldeamanuel, Y., Asrat, D., Lebbad, M., Beser, J., Worku, A., et al. (2008). Evaluation of Toluidine blue o staining for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* in expectorated sputum sample and bronchoalveolar lavage from HIV-infected patients in a tertiary care referral center in Ethiopia. *Infection* 36, 237–243. doi:10.1007/s15010-007-7191-8.

Alanio, A., Desoubeaux, G., Sarfati, C., Hamane, S., Bergeron, A., Azoulay, E., et al. (2011). Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1531–1537. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03400.x.

Alanio, A., Gits-Muselli, M., Mercier-Delarue, S., Dromer, F., and Bretagne, S. (2016a). Diversity of *Pneumocystis jirovecii* during infection revealed by ultra-deep pyrosequencing. *Front. Microbiol.* 7:733. doi:10.3389/fmicb.2016.00733.

Alanio, A., Hauser, P.M., Lagrou, K., Melchers, W.J., Helweg-Larsen, J., Matos, O., et al. (2016b). ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2386–2396. doi:10.1093/jac/dkw156.

Alanio, A., Vernel-Pauillac, F., Sturny-Leclère, A., and Dromer, F. (2015). *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. *MBio* 6:e2580-14. doi:10.1128/mBio.02580-14.

Bishop, L.R. and Kovacs, J.A. (2003). Quantitation of anti-*Pneumocystis jirovecii* antibodies in healthy persons and immunocompromised patients. *J. Infect. Dis.* 187, 1844–1848. doi:10.1086/375354.

Botterel, F., Cabaret, O., Foulet, F., Cordonnier, C., Costa, J.M., and 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. doi:10.1128/JCM.06036-11.

Catherinot, E., Lanternier, F., Bougnoux, M.E., Lecuit, M., Couderc, L.J., and Lortholary, O. (2010). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24, 107–138. doi:10.1016/j.idc.2009.10.010.

Choukri, F., Aliouat, E.M., Menotti, J., Totet, A., Gantois, N., Garin, Y.J.F., et al. (2011). Dynamics of *Pneumocystis carinii* air shedding during experimental pneumocystosis. *J. Infect. Dis.* 203, 1333–1336. doi:10.1093/infdis/jir018.

Choukri, F., Menotti, J., Sarfati, C., Lucet, J.C., Nevez, G., Garin, Y.J.F., et al. (2010). Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 51, 259–265. doi: 10.1086/653933.

Cissé, O.H., Pagni, M., and Hauser, P.M. (2012). De novo assembly of the *Pneumocystis jirovecii* genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. *MBio* 4:e428-12. doi:10.1128/mBio.00428-12

- Cushion, M.T.** (2010). Are Members of the fungal genus *Pneumocystis* (a) Commensals; (b) Opportunists; (c) Pathogens; or (d) all of the above? *PLoS Pathog.* 6:e1001009. doi: 10.1371/journal.ppat.1001009.
- Cushion, M.T. and Keely, S.P.** (2013). Assembly and annotation of *Pneumocystis jirovecii* from the human lung microbiome. *mBio* 4, e224-13. doi: 10.1128/mBio.00224-13.
- El-Hattab, A.W. and Scaglia, F.** (2013). Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics* 10, 186–198. doi:10.1007/s13311-013-0177-6.
- Flori, P., Belleste, B., Durand, F., Raberin, H., Cazorla, C., Hafid, J., et al.** (2004). Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J. Med. Microbiol.* 53, 603–607. doi:10.1099/jmm.0.45528-0.
- Gigliotti, F. and Wright, T.W.** (2012). *Pneumocystis*: where does it live? *PLoS Pathog.* 8:e1003025. doi:10.1371/journal.ppat.1003025.g001.
- Hauser, P.M., Bille, J., Lass-Flörl, C., Geltner, C., Feldmesser, M., Levi, M., et al.** (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, 1872–1878. doi:10.1128/JCM.02390-10.
- Islam, R., Weir, C.R., Jones, M., Del Fiol, G., and Samore, M.H.** (2015). Understanding complex clinical reasoning in infectious diseases for improving clinical decision support design. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* 15:101. doi: 10.1186/s12911-015-0221-z.
- Linssen, C.F.M., Jacobs, J.A., Beckers, P., Templeton, K.E., Bakkers, J., Kuijper, E. J., et al.** (2006). Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage fluid samples. *J. Med. Microbiol.* 55, 1229–1235. doi:10.1099/jmm.0.46552-0.
- Louis, M., Guitard, J., Jodar, M., Ancelle, T., Magne, D., Lascols, O., et al.** (2015). Impact of HIV infection status on interpretation of quantitative PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3870–3875. doi: 10.1128/JCM.02072-15.
- Ma, L., Chen, Z., Huang, D.W., Kutty, G., Ishihara, M., Wang, H., et al.** (2016). Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. *Nat. Commun.* 7:10740. doi: 10.1038/ncomms10740.
- Ma, L., Huang, D.W., Cuomo, C.A., Sykes, S., Fantoni, G., Das, B., et al.** (2013). Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis*. *FASEBJ.* 27, 1962-1972. doi:10.1096/fj.12-224444.
- Meliani, L., Develoux, M., Marteau-Miltgen, M., Magne, D., Barbu, V., Poirot, J.L., et al.** (2003). Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50(Suppl.): 651. doi:10.1111/j.1550-7408.2003.tb00670.x.
- Montesinos, I., Brancart, F., Schepers, K., Jacobs, F., Denis, O., and Delforge, M. L.** (2015). Comparison of 2 real-time PCR assays for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in human immunodeficiency virus and non-HIV immunocompromised patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 82, 143-147. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.006.
- Mori, S., Cho, I., and Sugimoto, M.** (2009). A follow up study of asymptomatic carriers of *Pneumocystis jirovecii* during immunosuppressive therapy for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 36, 1600-1605. doi:10.3899/jrheum.081270.
- Mori, S., and Sugimoto, M.** (2012). *Pneumocystis jirovecii* infection: an emerging threat to patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology(Oxford)* 51, 2120-2130. doi:10.1093/rheumatology/kes244.
- Morris, A., and Norris, K.A.** (2012). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 297-317. doi:10.1128/CMR.00013-12.
- Mühlethaler, K., Bögli-Stuber, K., Wasmer, S., vonGarnier, C., Dumont, P., Rauch, A., et al.** (2012). Quantitative PCR to diagnose *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised non-HIV patients. *Eur. Respir. J.* 39, 971–978. doi: 10.1183/09031936.00095811.
- Pagano, L., Fianchi, L., Mele, L., Girmenia, C., Offidani, M., Ricci, P., et al.** (2002). *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with malignant haematological diseases: 10 years' experience of infection in GIMEMA centres. *Br. J. Haematol.* 117, 379-386. doi:10.1046/j.1365-2141.2002.03419.x.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *NucleicAcidsRes.* 29:e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- Reid, A.B., Chen, S.C.A., and Worth, L.J.** (2011). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients: new risks and diagnostic tools. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 534-544. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834cac17.
- Roblot, F., Le Moal, G., Godet, C., Hutin, P., Texereau, M., Boyer, E., et al.** (2003). *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with hematologic

malignancies: a descriptive study. *J. Infect.* 47, 19-27. doi:10.1016/S0163-4453(03)00038-0.

Rocheteau, P., Chatre, L., Briand, D., Mebarki, M., Jouvion, G., Bardon, J., et al. (2015). Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. *Nat. Commun.* 6:10145. doi:10.1038/ncomms10145.

Roux, A., Canet, E., Valade, S., Gangneux-Robert, F., Hamane, S., Lafabrie, A., et al. (2014). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with or without AIDS. France. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1490-1497. doi:10.3201/eid2009.131668.

Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 34, 374–378.

Schildgen, V., Mai, S., Khalfaoui, S., Lusebrink, J., Pieper, M., Tillmann, R.L., et al. (2014). *Pneumocystis jirovecii* can be productively cultured in differentiated CuFi-8 airway cells. *mBio* 5:e1186-14. doi:10.1128/mBio.01186-14.

Tamburrini, E., Mencarini, P., Visconti, E., De Luca, A., Zolfo, M., Siracusano, A., et al. (1996). Imbalance between *Pneumocystis carinii* cysts and trophozoites in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pneumocystosis receiving prophylaxis.

J. Med. Microbiol. 45, 146-148. doi: 10.1099/00222615-45-2-146.

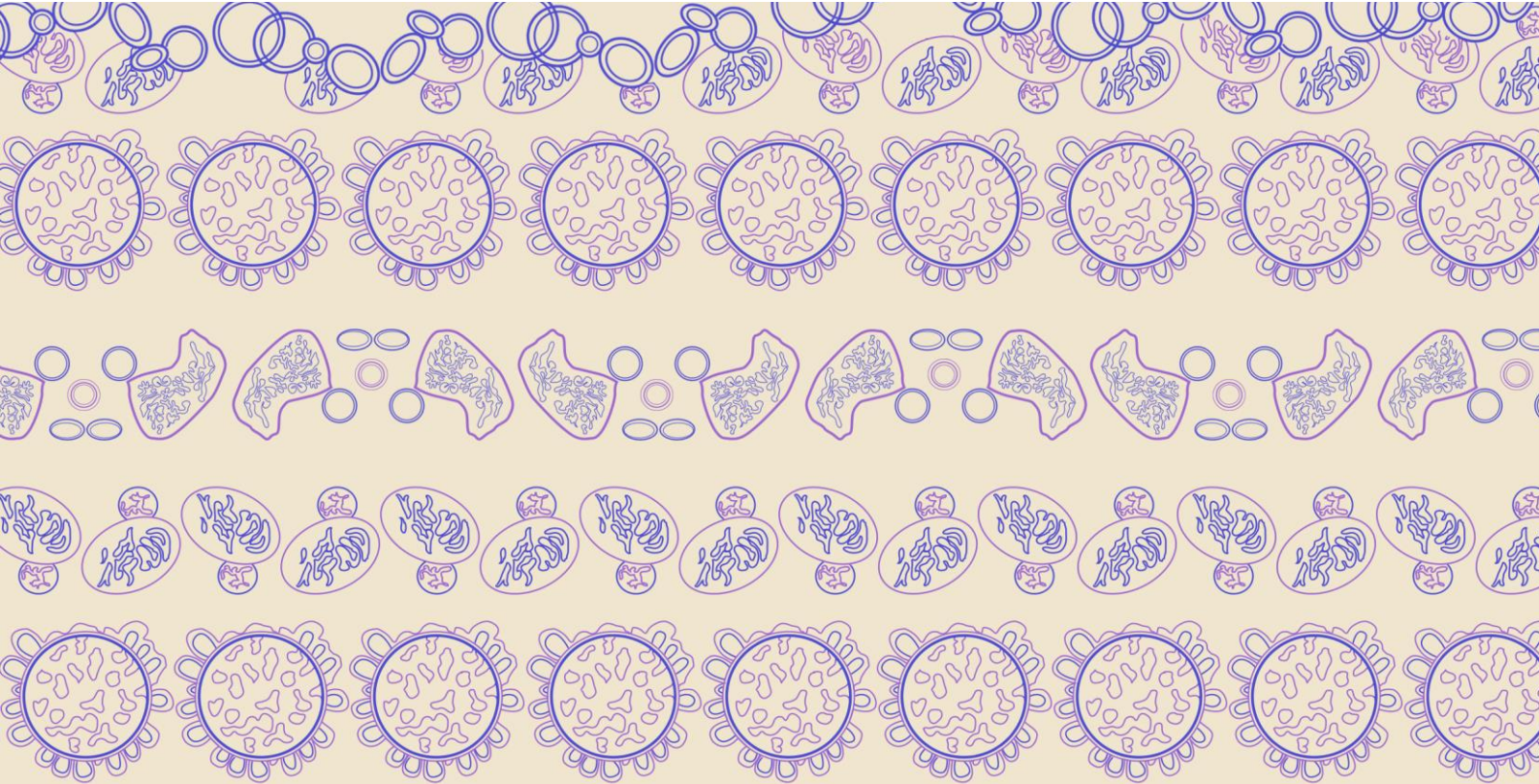
Tasaka, S., and Tokuda, H. (2012). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV- infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J. Infect. Chemother.* 18, 793-806. doi: 10.1007/s10156-012-0453-0.

Vandesompele, J., de Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., de Paepe, A., et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1-12. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034

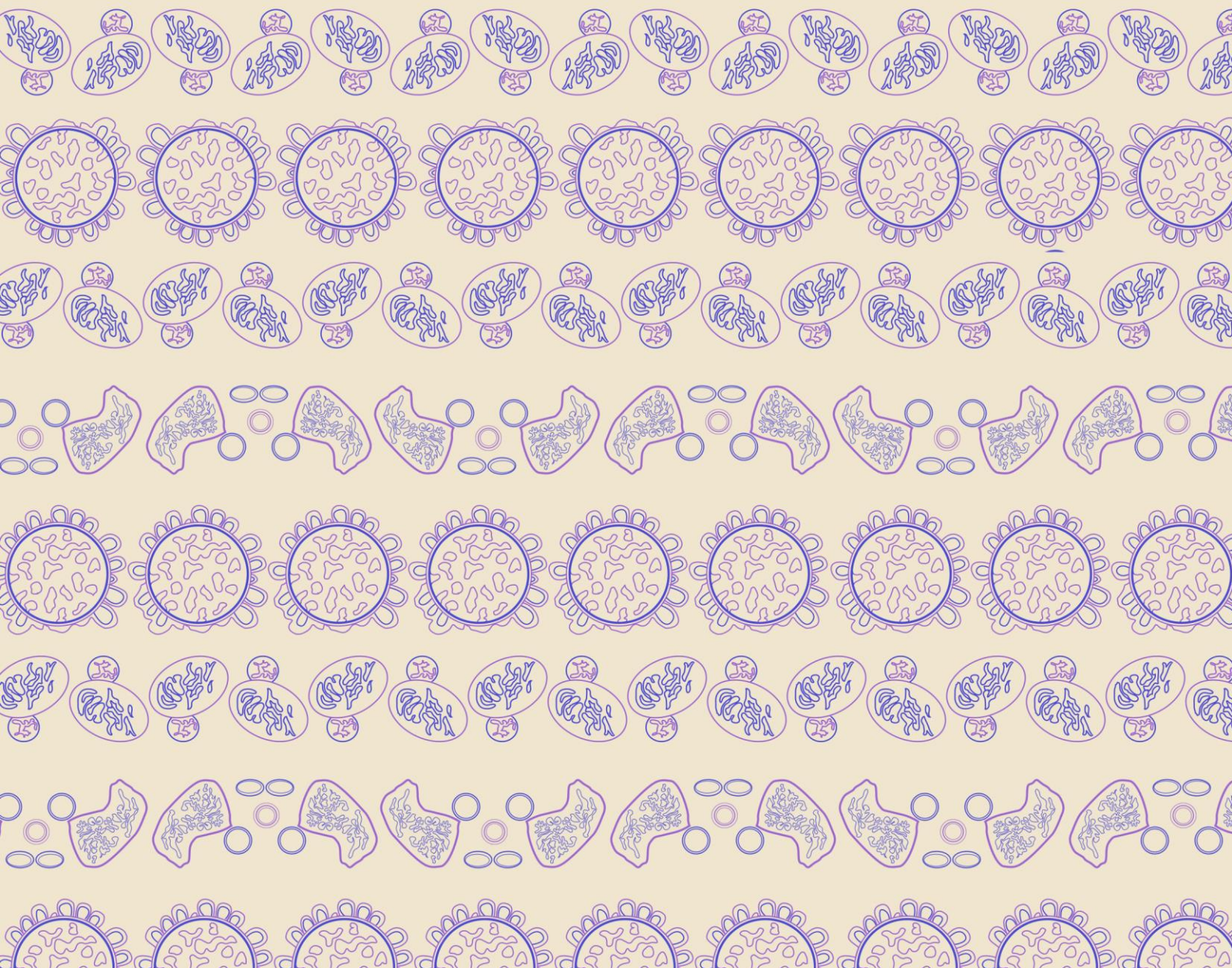
Vargas, S.L., Hughes, W.T., Santolaya, M.E., Ulloa, A.V., Ponce, C.A., Cabrera, C. E., et al. (2001). Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin. Infect. Dis.* 32, 855-861. doi: 10.1086/319340.

Wakefield, A.E., Pixley, F.J., Banerji, S., Sinclair, K., Miller, R.F., Moxon, E.R., et al. (1990). Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 336, 451-453. doi:10.1016/0140-6736(90)92008-6.

Wissmann, G., Morilla, R., Martín-Garrido, I., Friaza, V., Respaldiza, N., Povedano, J., et al. (2010). *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients treated with infliximab. *Eur. J. Clin. Invest.* 41, 343-348. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02415.x.



5. Objetivo tercero



NUEVOS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE *Histoplasma capsulatum*

Desarrollo y validación de una base de datos de perfiles proteicos para la identificación de *H. capsulatum* mediante la EM MALDI-ToF.

Publicación original: Valero C, Buitrago MJ, Gago S, Quiles-Melero I, García-Rodríguez J. A matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry reference database for the identification of *Histoplasma capsulatum*. *Med Mycol.* 2017.

El aislamiento y la identificación de *H. capsulatum* a partir de cultivo es uno de los métodos de referencia para el diagnóstico de la histoplasmosis. Sin embargo, es un método lento, requiere de instalaciones de contención de tipo III y, con frecuencia, necesita de otros métodos adicionales para confirmar el diagnóstico. En los últimos años, la EM MALDI-ToF se ha establecido como una herramienta eficaz para la identificación de microorganismos patógenos y se ha demostrado su utilidad en la identificación de especies fúngicas.

En este trabajo se construyó una base de datos de espectros proteicos de referencia a partir de seis cepas de *H. capsulatum* pertenecientes a la colección del Servicio de Micología. La validación de esta base de datos se realizó mediante un ensayo en ciego donde se incluyeron un total de 63 cepas: 30 cepas de *H. capsulatum* en fase filamentosa, 14 de las cuales también en fase levaduriforme, y 33 cepas pertenecientes a otras especies de hongos, utilizadas para evaluar la especificidad de la base de datos construida.

Casi todas las cepas de *H. capsulatum* se identificaron correctamente con una especificidad del 100% y el 86,6% de ellas obtuvo una puntuación mayor de 1,7, considerado por el fabricante como el valor adecuado para la identificación a nivel de género. El descenso de este punto de corte permitió aumentar la sensibilidad sin sacrificar la especificidad de la técnica. Además, se pudo adelantar el tiempo requerido para la identificación respecto al método clásico, ya que las formas filamentosas se identificaron a los siete días de crecimiento, momento en que todavía no presentaban los caracteres morfológicos necesarios para su identificación mediante examen microscópico.

Objetivo tercero

Los resultados de este estudio indican que la tecnología EM MALDI-ToF permite una identificación rápida y eficaz de *H. capsulatum*, implicando la reducción del tiempo de respuesta en el diagnóstico de la histoplasmosis y una disminución del riesgo biológico asociado a la manipulación del hongo.

A matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry reference database for the identification of *Histoplasma capsulatum*

Valero C¹, Buitrago MJ^{1*}, Gago S¹, Quiles-Melero I², García-Rodríguez J²

¹Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid), Spain.

²Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.

*Corresponding author: Dr. María José Buitrago. Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Carretera Majadahonda-Pozuelo Km2. 28220 (Madrid), Spain. e-mail: buitrago@isciii.es. Phone: +34-91-8223425 and Fax: +34-91-5097919.

ABSTRACT

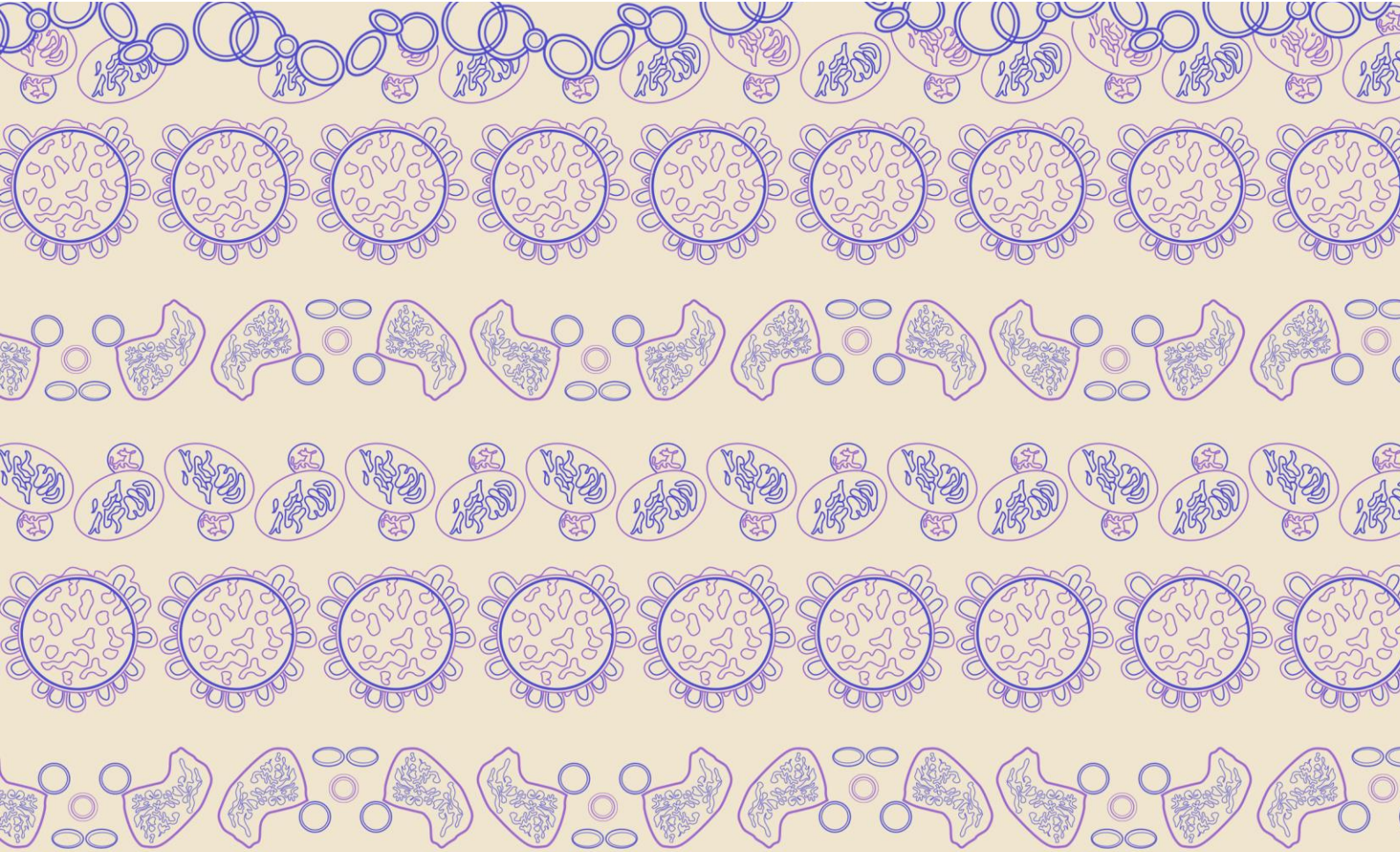
The isolation of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* from cultures together with the visualization of typical intracellular yeast in tissues are the gold standard methods for diagnosis of histoplasmosis. However, cultures are time-consuming, require level 3 containment and experienced personnel, and usually call for an additional confirmation test. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS) has been established as a suitable tool for microbial identification in several clinical laboratories. A reference database has been constructed for the identification of *H. capsulatum* by MALDI-ToF MS by using six *H. capsulatum* strains previously identified by molecular methods. For validation, 63 fungal strains belonging to the Collection of the Spanish National Centre for Microbiology were tested against the new reference database combined with other commercial and in-house databases. In a blind assay, all *H. capsulatum* strains (n=30) were correctly identified by the database and 86.6% had scores above 1.7. Considering both phases of the fungus for the same strain, the most reliable results were obtained with the mycelial phase, with only 13.3% of isolates having scores below 1.7. The new database was able to identify both morphological phases of the fungus. MALDI-ToF technology yields a prompt and simple identification from *H. capsulatum* yeast forms and early mycelial cultures. It allows for reducing response time and decreasing risk in fungus manipulation.

Keywords: MALDI-ToF mass spectrometry, *Histoplasma capsulatum*, fungal identification, reference database, endemic mycoses.

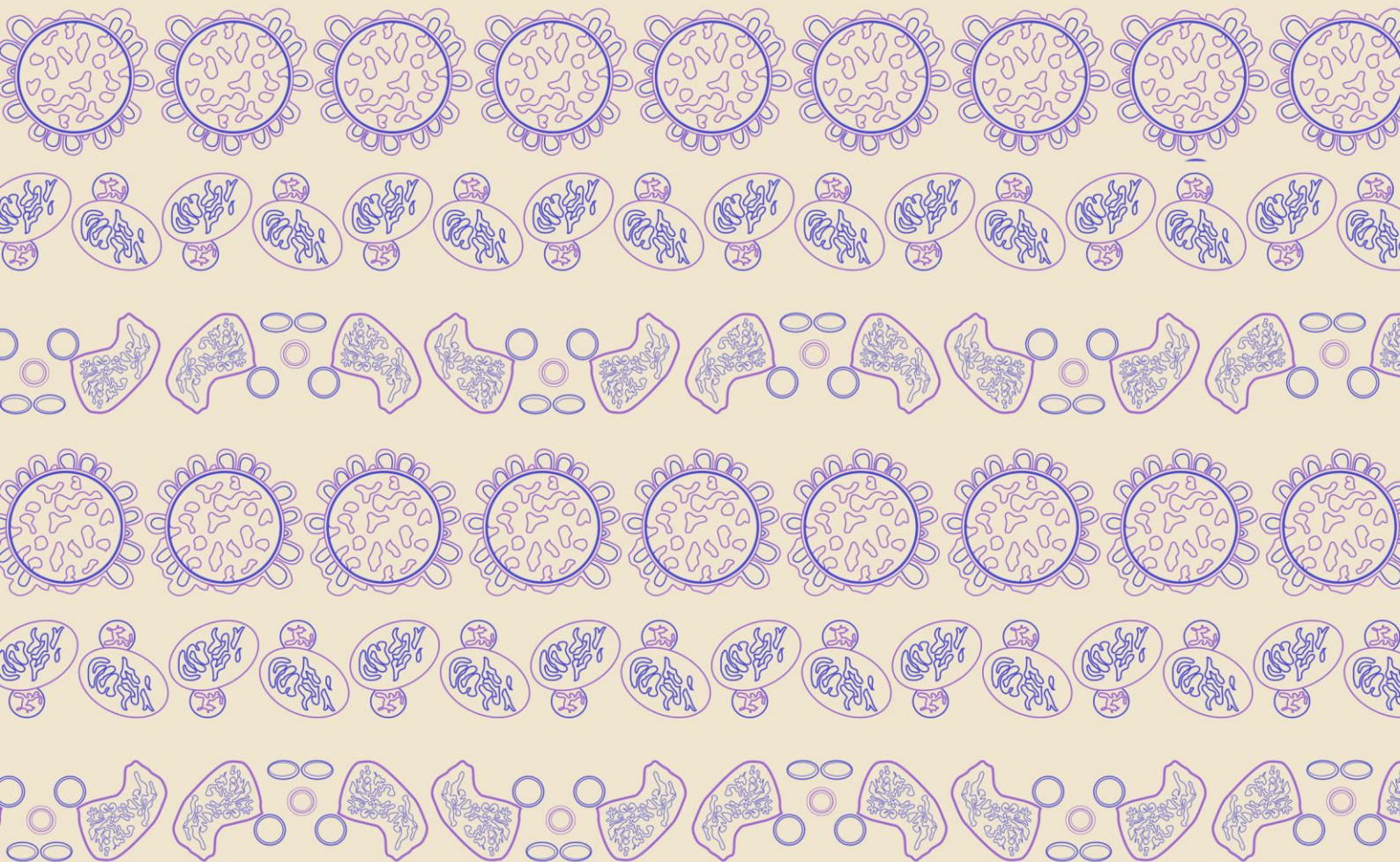
INTRODUCTION

Histoplasmosis is an endemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*¹. Three varieties of the fungus are recognized, two of which are pathogenic to humans: *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, which causes classical or American histoplasmosis and is widely distributed but endemic to the valleys of large American rivers, and *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*,

which is the causal agent of African histoplasmosis and is endemic in equatorial Africa^{2,3}. The third, *Histoplasma capsulatum* var. *farcinosum*, is distributed in countries bordering the Mediterranean Sea and causes epizootic lymphangitis in horses⁴. Although there are no autochthonous cases, the incidence of this disease has increased in recent years in Spain due to migration from endemic areas and the transit of travellers proceeding from those areas⁵. Clinical features



6. Objetivo cuarto



ESTUDIO DE LA HISTOPLASMOSIS AFRICANA FUERA DE ZONA ENDÉMICA

Estudio de la histoplasmosis africana fuera de zona endémica y evaluación de diferentes métodos de identificación de las variedades patógenas de *H. capsulatum*.

Publicación original: Valero C, Gago S, Monteiro MC, Alastruey-Izquierdo A, Buitrago MJ. African histoplasmosis: new clinical and microbiological insights. *Med Mycol*. 2017. doi: 10.1093/mmy/myx020.

Las dos variedades de *H. capsulatum* patógenas en humanos: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, causante de la histoplasmosis clásica, y *H. capsulatum* var. *duboisii*, causante de la histoplasmosis africana en sentido estricto, coexisten en África. Sin embargo, los estudios para diferenciarlas son muy escasos, antiguos y las cepas africanas se encuentran poco representadas en la mayoría de los trabajos llevados a cabo.

En este trabajo se revisaron 13 casos de pacientes diagnosticados con histoplasmosis africana en el Servicio de Micología. Se observó que la mayoría (10 de 13) presentaban enfermedad diseminada e inmunosupresión debida a la infección por el VIH, aunque la histoplasmosis africana se había considerado, tradicionalmente, como una presentación rara en este tipo de pacientes. Además, con el objetivo de diferenciar las variedades del hongo, se estudiaron las cepas aisladas de muestras de cinco de estos pacientes, junto a otras cepas obtenidas de colecciones internacionales y propias de la colección del Servicio de Micología. Los métodos clásicos de identificación, basados en la detección de la actividad ureasa y la medición del tamaño de las levaduras, no permitieron la diferenciación de las dos variedades. Por otro lado, los métodos moleculares llevados a cabo (MLSA y determinación del tipo sexual) permitieron agrupar las cepas africanas de las dos variedades, indicando su relación genética, lo que sugiere que la clasificación tradicional del hongo en tres variedades debe ser revisada. Por último, se observó una distribución desigual del tipo sexual en las cepas de origen africano.

En definitiva, ni los conceptos clásicos sobre la infección ni los métodos clásicos de identificación fueron útiles para distinguir entre las variedades del hongo, mientras que los análisis moleculares llevados a cabo permitieron la agrupación conjunta de todas las

Objetivo cuarto

cepas africanas incluidas en el estudio, sugiriendo que la clasificación tradicional debería ser revisada. Estos resultados evidencian la necesidad de más estudios para desentrañar los conceptos tradicionales de la histoplasmosis africana y determinar su validez en la actualidad.

African histoplasmosis: new clinical and microbiological insights

Valero C¹, Gago S¹, Monteiro MC¹, Alastruey-Izquierdo A¹, Buitrago MJ^{1*}

¹Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid), Spain.

*Corresponding author: Dr. María José Buitrago. Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Carretera Majadahonda-Pozuelo Km2. 28220 (Madrid), Spain. e-mail: buitrago@isciii.es. Phone: +34-91-8223425 and Fax: +34-91-5097919.

ABSTRACT

African histoplasmosis is defined as the fungal infection caused by *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* (*Hcd*). Studies focused on distinguishing *Hcd* and *H. capsulatum* var. *capsulatum* (*Hcc*), which coexist in Africa, are scarce or outdated and African strains are continuously underrepresented. In this work, 13 cases of African patients with histoplasmosis diagnosed in the Spanish Mycology Reference Laboratory have been reviewed showing that 77% had disseminated disease and AIDS as underlying disease although *Hcd* infection has been classically considered a rare presentation in AIDS patients. Strains isolated from these patients and other clinical and reference strains were studied by assessing classical identification methods and performing a three-loci multi-locus sequence analysis (MLSA). Classical identification methods based on biochemical tests and measurement of yeast size proved to be useless in distinguishing both varieties. The MLSA defined an African cluster, with a strong statistical support, that included all strains with African origin. Finally, mating type was also determined by using molecular methods revealing an unequal mating type distribution in African strains. In conclusion, historical statements and classical identification methods were useless to distinguish between varieties, whereas molecular analyses revealed that all strains with African origin grouped together suggesting that traditional classification should be revised. Further investigation is required in order to unravel traditional concepts about *Hcd* infection and support results obtained in this work.

Keywords: African histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, multi-locus sequence analysis, mating type

INTRODUCTION

Histoplasmosis is an endemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. The fungus is present mainly in the Americas, West Africa and some regions of Asia¹. Classically, two varieties have been reported to be pathogenic to humans: *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (*Hcc*)² and *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* (syn.

Histoplasma duboisii) (*Hcd*)³. *Hcd* is present exclusively in the African continent where both varieties coexist⁴. The clinical picture associated with *Hcd* infection is different from that associated with *Hcc*. Whereas *Hcc* primarily has been described as affecting lungs, *Hcd* infection involves mainly skin and subcutaneous tissues, rarely lungs⁵. In contrast to *Hcc*, HIV and *Hcd* coinfection has been described to be rare^{6,7}, which may be due to a problem of under-

reporting or under-recognition⁸. To date, pathogenesis, epidemiology, prevalence and mortality due to the African variety of the fungus remain unclear, due the scarcity of data and also similarities with other fungal species such as *Emmonsia* spp.⁹

With increased rates of travel and immigration from endemic areas^{10,11}, imported cases are described more frequently, mainly in countries receiving immigration from Africa such as Spain and France^{12,13}. However, differentiation between both varieties of the fungus has rarely been performed in isolated clinical strains and molecular analyses have been focused on comparing ITS sequences to NCBI database where it is poorly represented¹⁴ [Toscano, C. Imported African histoplasmosis by *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* in an HIV-2 infected patient. 6th Trends in Medical Mycology, 11–14 October 2013, Copenhagen, Denmark, P176].

Studies focused on distinguishing the two varieties are scarce and outdated and consist of investigating morphological, biochemical and immunological properties of *H. capsulatum* isolates¹⁵. *Hcd* yeast forms have been traditionally described as having larger size (6–12 µm) than those from *Hcc* (2–4 µm)¹⁶ thus definite diagnosis has usually been based on this evidence. In recent years, several molecular typing methods have been developed to investigate *H. capsulatum* epidemiology¹⁷. The study of polymorphisms in different DNA regions led to the identification of several phylogenetic clades with some considered as phylogenetic species. An African clade was defined which included *Hcd* and *Hcc* strains^{18,19}. However, African isolates were clearly underrepresented in these studies. Recently, a molecular analysis focusing on *H. capsulatum* *MAT1* locus, responsible for mating type identity, has been conducted showing an association between mating type and geographical origin of *H. capsulatum* isolates²⁰ but no *Hcd* strain was included in this study.

The aim of this study was to better understand epidemiology and clinical characteristics of African histoplasmosis and to investigate classical and molecular methods that could help to properly differentiate both varieties of the fungus in clinical setting. Cases from African patients diagnosed at the Spanish Mycology Reference Laboratory were retrospectively analyzed and a deep molecular analysis was performed with strains isolated from these patients in order to easily identify the varieties present in Africa.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A total of 13 histoplasmosis patients, immigrants or travelers from Africa, were diagnosed in the last 10 years in the Spanish National Center for Microbiology (Majadahonda, Spain) (**Table 1**). Diagnosis was performed by classical methods and a quantitative real-time PCR assay (qPCR)²¹. In addition, cases were classified following the EORTC/MSG Consensus Group criteria (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group)²². This study was retrospective and non-interventional. All clinical samples included in this study belonged to the collection of clinical specimens of the Mycology Reference Laboratory and were previously anonymized in compliance with Spanish law (Ley Orgánica 15/1999).

Fungal strains

Fifty strains belonging to the Fungal Collection of the Spanish National Center for Microbiology (Majadahonda, Spain) (CNM-CM), CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) collection, and ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) collection were used to conduct this study. All available clinical and epidemiological data are listed in **Table S1**.

Table 1. Epidemiological and clinical characteristics of African patients with histoplasmosis.

Age/sex	Patient origin ^a	Underlying disease ^b	Clinical findings/Hc infection	Sample origin	ID test result	PCR result	Definite diagnosis method/IFI classification
39/M	Sub-Saharan Africa	HIV	ND/DH	Plasma	Negative	Positive	HP/Proven
24/F	Nigeria	HIV	Respiratory symptoms (miliar pattern) and pelvic inflammatory disease/DH	Bone marrow	Negative	Positive	None/Possible
22/F	Senegal	HIV	ND/DH	Plasma	Positive	Positive	Culture [#] /Proven
				Bone marrow		Negative	
54/M	Spain*/ Sub-Saharan Africa	IC	Respiratory symptoms/APH	Serum	Weak positive	ND	None/Probable
				Blood		Negative	
				Lung biopsy		Positive	
				Sputum		Positive	
63/M	Sub-Saharan Africa	SOT	Pyomyositis/PM	Serum	Positive	Negative	Culture/Proven (CNM-CM 5788)
				Blood		Negative	
				Biopsy		Positive	
47/M	Sub-Saharan Africa	HIV (114)	Severe aphonia and skin lesions/DH	Larynx biopsy		Positive	HP/Proven
67/M	Greece*/ DR of Congo ¹⁴	IC	Pustule in his right upper thigh/CPH	Skin biopsy		Positive	HP/Proven
				Serum	NP	Negative	
32/F	Equatorial Guinea (6)	HIV (5)	Fever, chills, diarrhea and headache/DH	Serum	NP	Positive	Culture/Proven (CNM-CM 7001)
53/M	Sub-Saharan Africa	HIV	Constitutional syndrome and adenopathy/DH	Adenopathy		Positive	HP/Proven
48/M	Ghana	HIV	Constitutional syndrome and oral lesion/DH	Oropharyngeal exudate		Positive	Culture [#] /Proven
35/M	Ghana (12)	HIV	Respiratory symptoms, fever and adenopathy/DH	BAS		Positive	Culture/Proven (CNM-CM 7704)
				Blood		Negative	
50/M	Nigeria (10)	HIV	Lymph nodes/DH	Adenopathy		ND	Culture/Proven (CNM-CM 7767)
47/M	Ghana (35)	HIV	Constitutional syndrome and skin lesions/DH	Skin biopsy		ND	Culture/Proven (CNM-CM 8013)

Note: Results of diagnostic tests performed, classification of cases based in EORTC/MSG criteria and *H. capsulatum* clinical manifestations for each patient are shown.

M: Male; **F:** Female; **HIV:** Human Immunodeficiency Virus; **IC:** Immunocompetent; **SOT:** Solid Organ Transplant; **ID:** Immunodiffusion; **HP:** Histopathology; **DH:** Disseminated Histoplasmosis; **APH:** Acute Pulmonary Histoplasmosis; **CPH:** Cutaneous Primary Histoplasmosis; **PM:** Pyomyositis; **ND:** No Data; **NP:** Not Performed.

^aYears in Spain between brackets.

^bCD4 count in cells/mm³ between brackets.

*Travellers or long term stay in Africa.

[#]Cases in which *H. capsulatum* strain was not available for further studies.

Strains were grown at 30 °C on Sabouraud dextrose agar tubes (SDA) under biosafety level III (BSL3) facilities in compliance with Spanish law (Real Decreto 664/1997). For yeast phase conversion, strains were subcultured on ML-Gema agar medium tubes²³ for 2-3 weeks at 37 °C.

Urease test

H. capsulatum strains included in the study were subcultured on urease medium agar tubes at 30 °C for two weeks in BSL3 facilities. A positive result was considered when color media changed from yellow to bright pink. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* CECT 1078 and *Candida albicans* ATCC 645551 were used as positive and negative controls for the technique, respectively.

Analysis of yeast size by flow-cytometry

Fourteen strains were used in this study and analyzed by flow-cytometry to measure yeast size. In BSL3 facilities, yeast cells were collected from the surfaces of ML-Gema cultures after 14 days of incubation at 30 °C, placed in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and adjusted to 1×10^{10} cells/ml. Subsequently, after a centrifugation at $13.000 \times g$ for 5 min, the pellet was resuspended in 100 μ l of paraformaldehyde (PAF) 4% for 30 min. To ensure a complete killing of fungi, yeast fixed suspensions were also cultured in SDA tubes at 30 °C for two months. Once inactivation was verified, yeast suspensions were conserved at 4 °C in a BSL2 laboratory. The propidium iodide (PI) staining protocol was developed as described by other authors²⁴. Yeast cell sizes were measured in duplicate experiments using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, Woburn, MA, USA) and a sorting gate was used to avoid size measurement of duplexes and cell aggregates. Flow-cytometry data were processed using FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software,

La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis.

DNA isolation and target amplification

DNA extraction from fungal cultures was performed under BSL3 containment using the Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, USA) following manufacturer instructions. DNA obtained was quantified and its quality was checked using Nanodrop 2000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, USA).

PCRs were performed in a 50 μ l final volume reaction containing: 1 μ M of each primer, 0.2 μ M deoxynucleoside triphosphate (Roche Diagnostics, Madrid, Spain), 5 μ l of PCR 10x buffer II (Applied Biosystems, California, USA), 2 mM MgCl₂, 1.5 U of Taq DNA polymerase (Applied Biosystems, California, USA) and 30-50 ng of genomic DNA. PCR amplification was carried out in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, California, USA) and PCR conditions were as follows: an initial step of 95 °C for 5 min followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, an annealing temperature which varied with each target (**Table S2**) for 45 s and 72 °C for 2 min with a final step at 72 °C for 5 min. PCR products were resolved by electrophoresis on ethidium bromide stained agarose gels and were purified using Illustra Exoprostar 1-step (GE Healthcare Life Science, UK). In the case of mating type characterization, genotype discrimination was performed by excluding either *MAT1-1* or *MAT1-2* amplification in the agarose gel.

Sequence analysis

Sequencing was carried out with the Big-Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, California, USA) following manufacturer instructions, in an ABI DNA Analyzer 3730xl (Applied Biosystems, California, USA) using the same PCR amplification primers.

Sequences were generated from both strands and edited using Lasergene software package (DNASTar Inc., Madison, Wisconsin, USA). Multiple sequence alignments were carried out by MUSCLE algorithm²⁵ implemented in MEGA software v 5.2.²⁶

The selection of nucleotide substitution models for sequence alignments was performed using jModelTest software v 2.1.4²⁷ and phylogenetic trees from individual and concatenated alignments were inferred based on a Maximum Likelihood (ML) approach with 1000 bootstrap replications for testing branch support using default settings.

Nucleotide sequence accession numbers

Sequences of products from PCRs of all genomic targets analyzed in this study were deposited in GenBank under the following range of accession numbers: KX645968-KX646167 (Table S3).

RESULTS

Epidemiological characteristics and diagnosis of African patients

Thirteen patients from Africa were diagnosed in the last decade in the Spanish Mycology Reference Laboratory (Table 1). The median age of patients was 47 (22-67) and most of them were men (10/13). All but one fulfilled proven (n=11) or probable (n=1) criterion. For Patient 2, there were only clinical suspicions and positive qPCR results and it was classified as possible. All but two were immigrants coming from Sub-Saharan regions and 11 out of 13 were immunocompromised patients, most of them with AIDS as underlying disease (10/11) and disseminated disease. There were two immunocompetent patients: one of them developed a cutaneous primary infection¹⁴ and the other was a Spanish traveler that developed acute pulmonary histoplasmosis.

Skin lesions were present only in three patients. The fungus was isolated in culture in 54% of the cases (7/13) and was observed by histopathological examination in 31% of them (4/13). Serological tests were positive in four out of seven sera tested (57%) and qPCR was positive in tested patients. qPCR was positive in 100% of biopsy, respiratory, adenopathy and plasma samples tested, but sensitivity decreased in samples of bone marrow (50%) followed by serum (33%) and no DNA was detected in any of the three blood samples tested (Table 1). At the moment of diagnosis, amplicon sequencing was performed but ITS1 rDNA sequence did not allow differentiating between varieties. Strains isolated from patients 5, 8, 11, 12 and 13 were available and included in molecular studies.

Urease test

All mycelia forms of *H. capsulatum* strains (n=50) tested for urease activity were urease positive. There was no correlation between urease test results and *H. capsulatum* varieties.

Yeast size assessment by flow-cytometry

Yeast sizes from 14 *H. capsulatum* strains were defined by measuring forward angle light scattering in a flow cytometer. This parameter is proportional to the cross-sectional area of the cells, and thus reflects their size. As shown in Fig. 1, CNM-CM 7001 (AS) and CBS 175.57 (*Hcd*), both with African origin, showed larger sizes, whereas CNM-CM 2721 (*Hcc*) exhibited the lowest size measurement. However, between these values, yeast size varied among all the rest of *H. capsulatum* strains not correlating with the variety to which they belong or their geographical origin. Moreover, a Mann-Whitney test comparing means of American and African strains yeast sizes was performed and no significant difference was observed ($p = 0.1206$).

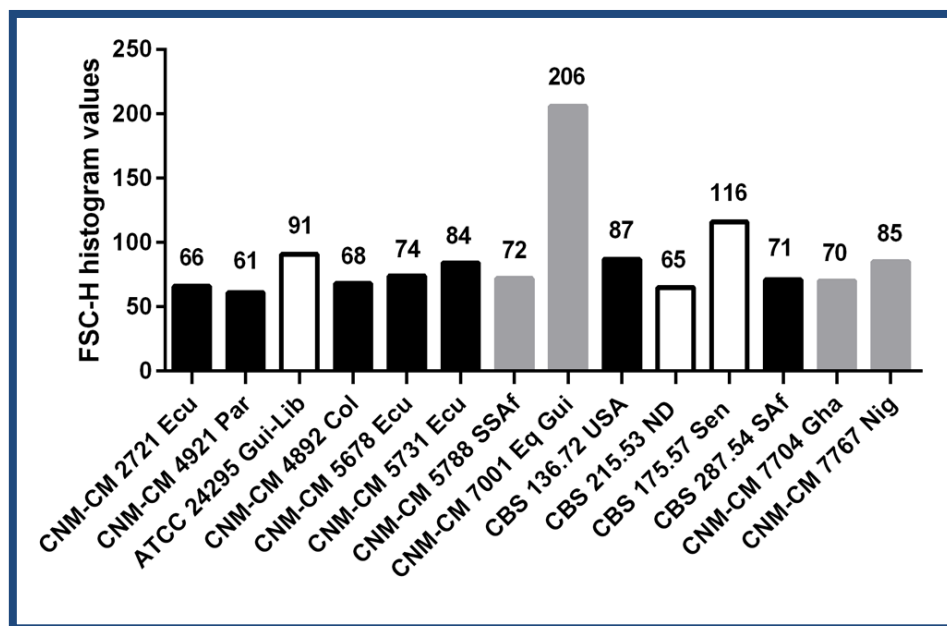


Fig. 1. Bar chart representing the FSC-H histogram values for the 14 isolates of *H. capsulatum* included in this study. Black-filled bars represent *Hcc* strains, empty bars *Hcd* strains, and AS are indicated by grey-filled bars. The letter code placed next to strain designations is the same for Fig. 2 and Fig. 3. Of note, we were not able to achieve strain CNM-CM 8013 yeast-phase conversion therefore it was not included in this analysis.

Multi-locus sequence analysis (MLSA) and phylogeny

DNA sequences of three genomic regions of 50 *H. capsulatum* strains (Table S1) were used to explore the genetic variability among them: ITS1-5.8S-ITS2-D1D2 rDNA region, a portion of *RPB1* gene, which encodes the largest subunit of RNA polymerase II, and a region of gene *OLE*, which encodes delta-9 fatty acid desaturase enzyme. For ITS-5.8S-ITS2-D1D2 alignment (1176 bp) Tamura-Nei (Trn) model²⁸ was selected according to results obtained from jModelTest analysis, whereas for *RPB1* (839 bp) and *OLE* alignments (419 bp) Kimura 2-parameter (K80) model²⁹ was chosen. African strains grouped together in all loci analyzed but only in the *OLE* tree showed bootstrap support (90%). However, one *Hcc* strain with African origin (CBS 287.54) grouped within this group in all inferred trees (Fig. S1).

Data for the three loci were combined into one phylogenetic analysis (2434 bp) (Fig. 2). African clade was supported by a bootstrap value of 97%, although South African *Hcc* strain CBS 287.54 remained grouped within this African

cluster.

Frequency and genetic diversity of *MAT1* locus

Mating type was analyzed for each strain: 46% (23/50) of the total number of strains showed *MAT1-1* genotype, whereas 54% (27/50) corresponded to the *MAT1-2* genotype. Regarding *H. capsulatum* varieties, in *Hcc* strains, an equal distribution of mating types was found, as 50% (21/42) of *Hcc* strains showed *MAT1-1* sequences and the remaining 50% (21/42) were described as having *MAT1-2* genotype. In contrast, among African strains, most of them were *MAT1-2* (75%, 6/8).

ML trees were inferred from these alignments based on the K80 model for *MAT1-1* sequences (390 bp) and the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) model³⁰ for *MAT1-2* sequences (534 bp). As a result, African strains with *MAT1-2* sequences (n=6) formed a defined group with a strong bootstrap support (99%). In contrast, those African strains showing *MAT1-1* genotype were underrepresented (n=2) but grouped in the same cluster as the *Hcc* strain with African origin CBS 287.54 (Fig. 3)

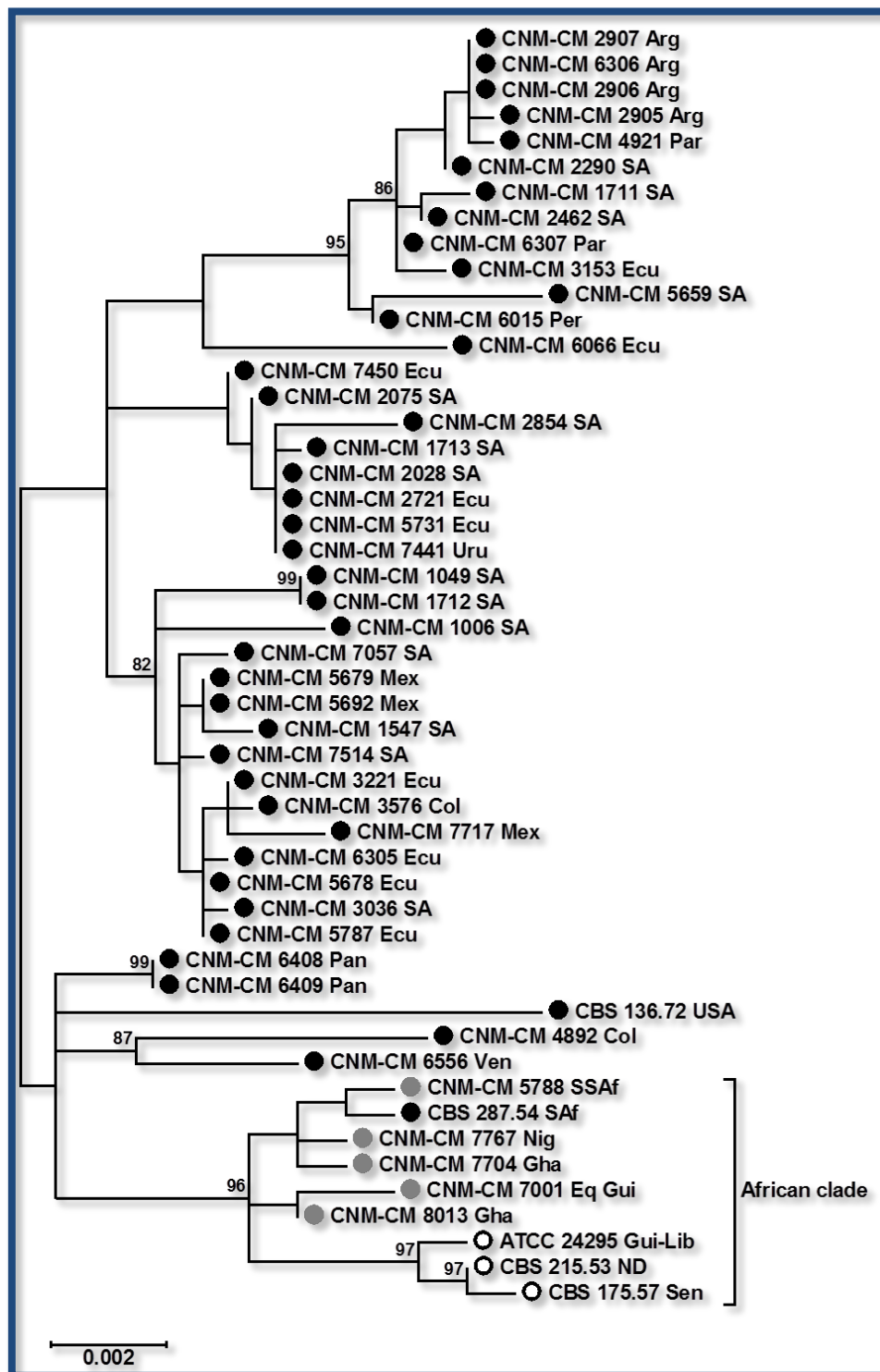


Fig.2. Combined molecular phylogenetic analysis of the three loci included in the MLSA. ML tree with the highest log likelihood based on the Tamura-Nei model is shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured by the number of substitutions per site. Only bootstrap values above 80% are marked. *Hcc* strains are indicated using black-filled circles, *Hcd* strains with empty circles and AS with grey-filled circles. The letter code next to strain designations indicates their geographical origin and dictates as follows: **Arg** (Argentina), **Par** (Paraguay), **Ecu** (Ecuador), **Per** (Peru), **Uru** (Uruguay), **Mex** (Mexico), **Col** (Colombia), **Pan** (Panama), **USA** (United States of America), **Ven** (Venezuela), **Nig** (Nigeria), **Gha** (Ghana), **Eq Gui** (Equatorial Guinea), **Gui-Lib** (Guinea-Liberia), **Sen** (Senegal), **SA** (South America), **SAF** (South Africa), **SSAf** (Sub-Saharan Africa), **ND** (No Data).

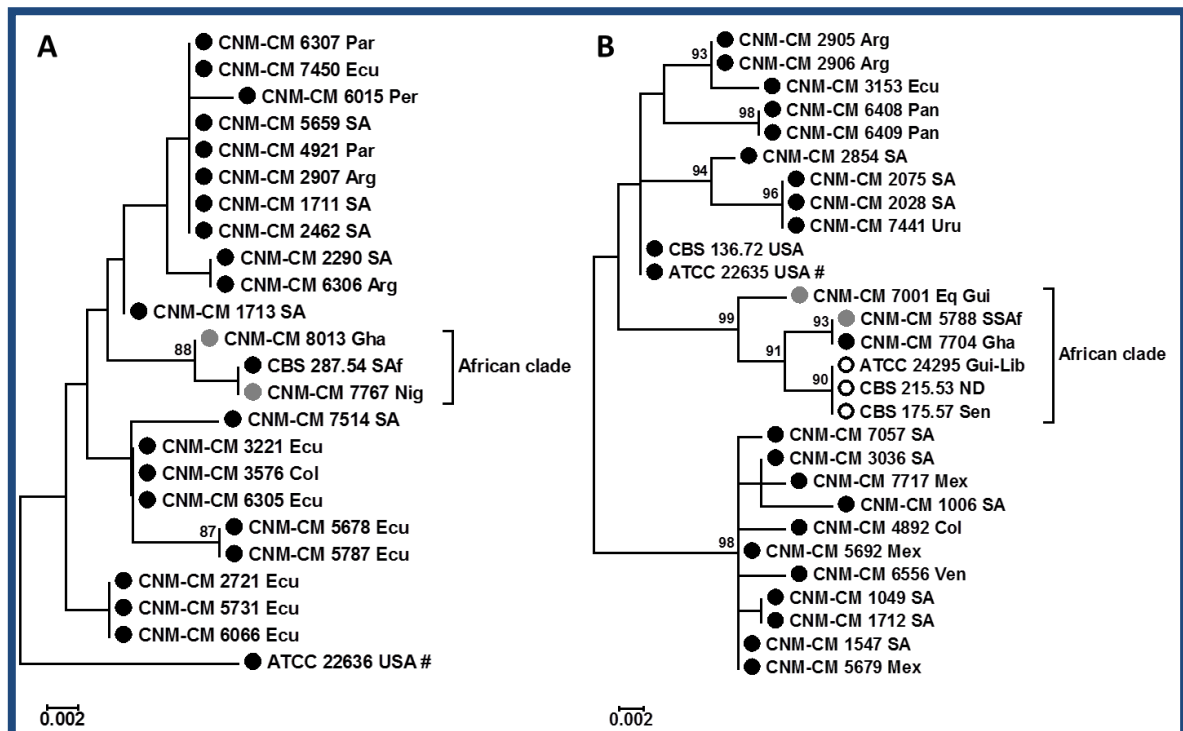


Fig. 3. Individual molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood (ML) method of *MAT1* locus. Trees are drawn to scale, with branch lengths measured by the number of substitutions per site. Trees with the highest log likelihood are shown. Only bootstrap values above 80% are marked. The letter code next to strain designations is explained in Fig. 2 and two *H. capsulatum* reference strains (#) were used to confirm mating type for each strain (*MAT1-1* (ATCC 22636) and *MAT1-2* (ATCC 22635) with accession numbers EF472256 and EF472255, respectively). **A)** ML tree based on Kimura 2-parameter model from analysis of *MAT1-1* idiomorph. **B)** ML tree based on Hasegawa-Kishino-Yano model from analysis of *MAT1-2* idiomorph. *Hcc* strains are indicated using black-filled circles, *Hcd* strains with empty circles and AS with grey-filled circles.

DISCUSSION

African histoplasmosis is defined as the disease caused by *H. capsulatum* var. *duboisii*, although both varieties of the fungus are present in Africa. Due to immigration and travel the prevalence of imported histoplasmosis from Africa has increased in some non-endemic regions of Europe. The identification of the variety causing the infection is challenging in these areas because the data regarding clinical presentation of patients and microbiological characteristics of the fungus are based on outdated and limited by small sample sizes studies^{5,15}. Moreover, open access sequence databases contain few entries of *Hcd* sequences for warranting a proper molecular identification. Finally, clinical data regarding African patients in Europe are scarce^{8,31,32} and,

frequently, identification of varieties has been based on histopathological observations and yeast size.

In contrast to classical clinical features about *Hcd* infection, the vast majority of African patients included in this study (11/13) had AIDS and disseminated disease whereas skin lesions were present only in three patients. However, it should be taken into account that, due to the limited number of patients, it could be a bias in clinical forms observed as most patients had AIDS as underlying disease.

Strains isolated from patients were studied along with other CNM-CM clinical strains and strains from international culture collections. First, classical methods to differentiate varieties were assessed: i) urease test was performed resulting in all strains analyzed being urease positive, indicating the pointlessness of this test

as already described by other authors^{33,34} and ii) yeast sizes were measured by using flow-cytometry but no significant differences were found among them. Size measurement was performed *in vitro* using specific culture conditions and additional studies should be performed in order to confirm these results.

Then, an MLSA based on amplifying, sequencing and analyzing three different genomic regions was performed. The three chosen regions were: the ITS1-5.8S-ITS2-D1D2 region of rDNA, as it is considered the universal barcode marker for fungi³⁵; the *RPB1* gene, described as an alternative to ITS barcoding and included in the AFToL (Assembling the Fungal Tree Of Life) project³⁶; and the *OLE* gene which has demonstrated to provide information related to geographical origin of *H. capsulatum* strains³⁷. When data from the three *loci* were combined in a single phylogenetic analysis, an African clade achieved strong statistical support (96% of bootstrap value), but the South African *Hcc* CBS 287.54 isolate remained included in this group showing that it is genetically related with *Hcd* and AS strains included in this work.

Finally, mating type was identified for all strains included in the assay by using molecular methods. In this study, the mating type ratio was near 1:1 in contrast to previous studies that showed *MAT1-2* prevalence in clinical samples³⁸. In addition, although *Hcc* strains showed identical distribution of the two mating types, African isolates exhibited a ratio of 1:3 with 1-2 mating type being strongly predominant. When analyzing *MAT1-1* and *MAT1-2* sequences, all African strains grouped with strong statistical support including the South African *Hcc* CBS 287.54 isolate. This is the first time that mating type is studied in African strains by using molecular methods and it should be further investigated in a bigger number of African strains in order to provide more information to support results found in this work.

Taking the results together, all strains with

African origin grouped together in performed molecular analyses. Strain CBS 287.54 always grouped between these strains, although it was classified at CBS as *Hcc*. This suggests that it could be erroneously classified and further studies should be performed in order to confirm its identification.

In conclusion: i) historical statements about clinical characteristics of the infection caused by *H. capsulatum* var. *duboisii* were useless to distinguish between varieties in our clinical setting, ii) classical microbiological methods were not conclusive either, and iii) MLSA allowed defining an African cluster that included *Hcc* and *Hcd* strains from international collections and all the strains isolated from patients, supporting previous studies^{18,19} and suggesting that classical classification should be revised. Despite the limitations of this study due to a low sample size of African strains, to the best of our knowledge this is the first research that analyzes clinical characteristics of African histoplasmosis patients and includes strains isolated from these patients in a wide molecular analysis. Further investigation on clinical, microbiological and molecular features of African histoplasmosis is essential to unravel established classical concepts about the infection.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Details of all available clinical and epidemiological data of 50 *H. capsulatum* strains included in the study.

Table S2. Characteristics of primers used in multi-locus sequence analysis (MLSA).

Table S3. Genbank accession number database of *H. capsulatum* sequences analyzed in this study.

Fig. S1. Individual molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood (ML) method of the three *loci* included in the MLSA. Trees are drawn to scale, with branch lengths measured by the number of substitutions per site. Trees with the highest log

likelihood are shown. Only bootstrap values above 80% are indicated. **A)** ML tree based on the Tamura-Nei model from analysis of the ITS-5.8S-ITS2-D1D2 region. **B)** ML tree based on the Kimura 2-parameter model from analysis of the partial region of *RPB1* gene. **C)** ML tree based on the Kimura 2-parameter model from analysis of the partial region of *OLE* gene. *Hcc* strains are indicated using black-filled circles, *Hcd* with empty circles and AS with grey-filled circles. The letter code placed next to strain designations is the same for **Fig. 2** and **Fig. 3**.

FUNDING

This work was supported by research project PI11/00412 and PI14CIII/00045 from Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Instituto de Salud Carlos III. CV and SG were supported by a research fellowship from the Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Spanish Ministry of Science and Innovation (references FI12/00095 and FI10/00464, respectively).

DECLARATION OF INTEREST

Authors declare no conflicts of interest.

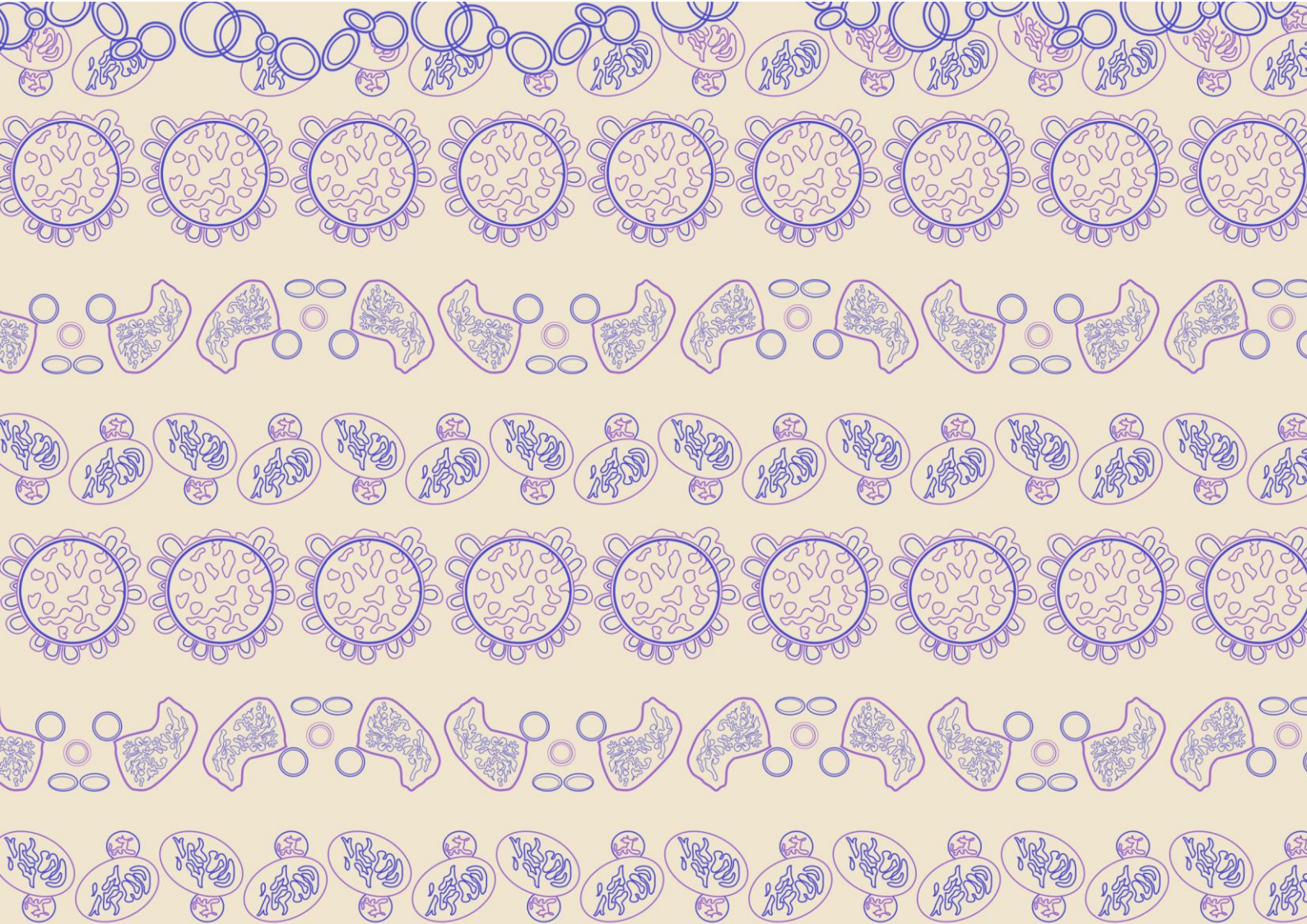
ACKNOWLEDGEMENTS

We cordially thank Frank Hodgkins for his careful reading and editing of the manuscript.

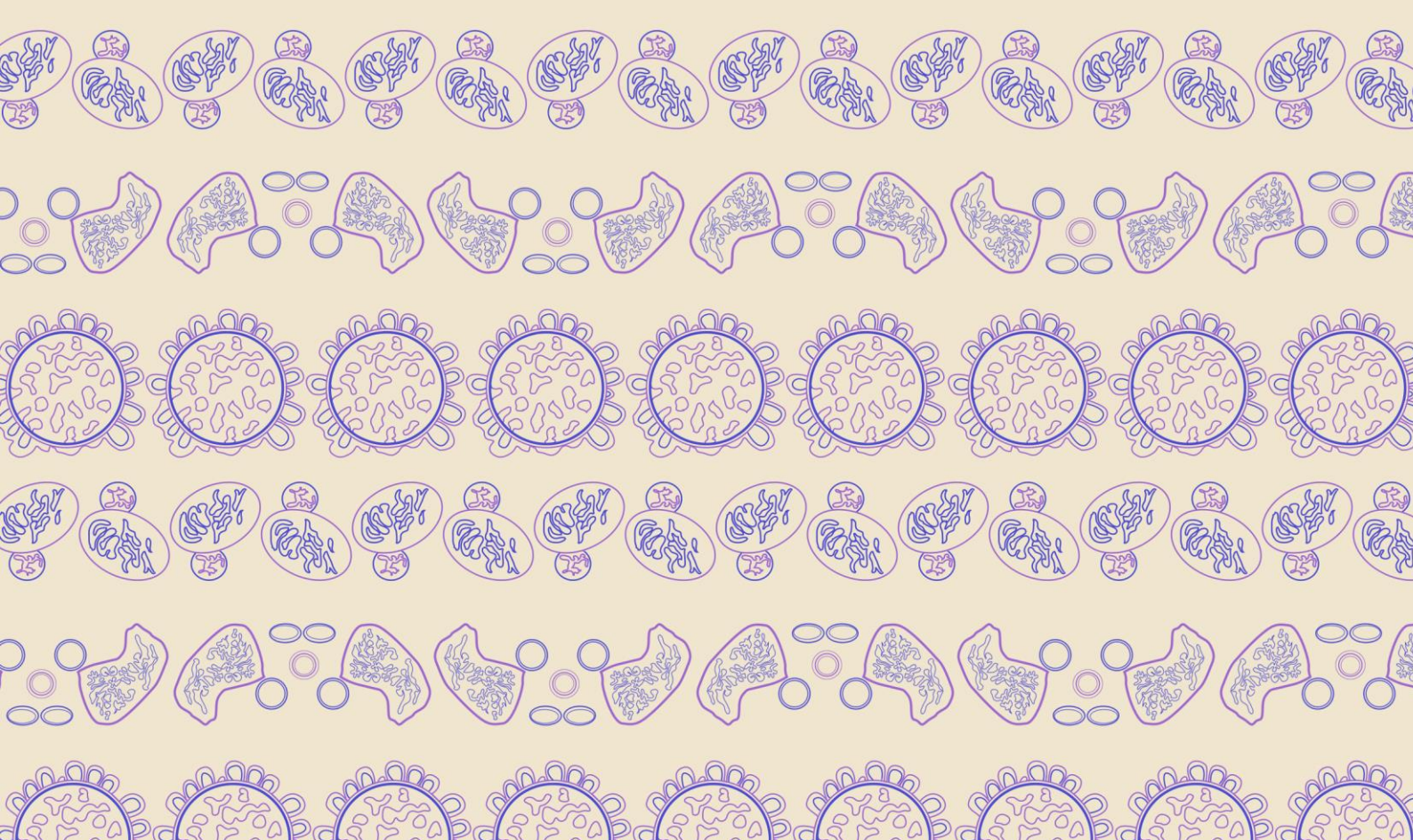
REFERENCES

1. Antinori S. *Histoplasma capsulatum*: more widespread than previously thought. *Am J Trop Med Hyg* 2014;90:982-983.
2. Darling ST. The morphology of the parasite (*Histoplasma capsulatum*) and the lesions of histoplasmosis, a fatal disease of tropical America. *J Exp Med* 1909;11:515-531.
3. Dubois A, Janssens PG, Brutsaert P, Vanbreuseghem R. [A case of African histoplasmosis; with a mycological note on *Histoplasma duboisii* n.sp]. *Ann Soc Belg Med Trop (1920)* 1952;32:569-584.
4. Bahr NC, Antinori S, Wheat LJ, Sarosi GA. Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River valley. *Curr Trop Med Rep* 2015;2:70-80.
5. Gugnani HC. Histoplasmosis in Africa: a review. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2000;42:271-277.
6. Carme B, Ngolet A, Ebikili B, Ngaporo AI. Is African histoplasmosis an opportunistic fungal infection in AIDS? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:293.
7. Chandenier J, Goma D, Moyen G, et al. [African histoplasmosis due to *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*: relationship with AIDS in recent Congolese cases]. *Sante* 1995;5:227-234.
8. Antinori S, Magni C, Nebuloni M, et al. Histoplasmosis among human immunodeficiency virus-infected people in Europe: report of 4 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2006;85:22-36.
9. Kenyon C, Bonorchis K, Corcoran C, et al. A dimorphic fungus causing disseminated infection in South Africa. *N Engl J Med* 2013;369:1416-1424.
10. Martin-Iguacel R, Kurtzhals J, Jouvion G, Nielsen SD, Llibre JM. Progressive disseminated histoplasmosis in the HIV population in Europe in the HAART era. Case report and literature review. *Infection* 2014;42:611-620.
11. Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. *J Travel Med* 2011;18:26-33.
12. Buitrago MJ, Cuenca-Estrella M. [Current epidemiology and laboratory diagnosis of endemic mycoses in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30:407-413.
13. Peigne V, Dromer F, Elie C, Lidove O, Lortholary O. Imported acquired immunodeficiency syndrome-related histoplasmosis in metropolitan France: a comparison of pre-highly active anti-retroviral therapy and highly active anti-retroviral therapy eras. *Am J Trop Med Hyg* 2011;85:934-941.
14. Tsiodras S, Drogari-Apiranthitou M, Pilichos K, et al. An unusual cutaneous tumor: African histoplasmosis following mudbaths: case report and review. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86:261-263.
15. Gugnani HC, Muotoe-Okafor F. African histoplasmosis: a review. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:155-159.
16. Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30:207-227.
17. Vite-Garin T, Estrada-Barcenas DA, Cifuentes J, Taylor ML. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. *Rev Iberoam Micol* 2014;31:11-15.

18. Kasuga T, White TJ, Koenig G, *et al.* Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 2003;12:3383-3401.
19. Teixeira MM, Patane JS, Taylor ML, *et al.* Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004732.
20. Rodriguez-Arellanes G, Nascimento de SC, de Medeiros-Muniz M, *et al.* Frequency and genetic diversity of the *MAT1* locus of *Histoplasma capsulatum* isolates in Mexico and Brazil. *Eukaryot Cell* 2013;12:1033-1038.
21. Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:665-668.
22. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;46:1813-1821.
23. Fressatti R, Dias-Siqueira VL, Svidzinski TI, Herrero F, Kimmelmeyer C. A medium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* into its yeast-like form. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87:53-58.
24. De Lucas JR, Domínguez AI, Mendoza A, Laborda F. Use of flow-cytometry to distinguish between haploid and diploid strains of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics Newsletter* 1998;45:7-9 (<http://www.fgsc.net/fgn45/fgn45De%20Lucas.pdf>).
25. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1792-1797.
26. 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;28:2731-2739.
27. Durrbin D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 2012;9:772.
28. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol* 1992;9:678-687.
29. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111-120.
30. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 1985;22:160-174.
31. Inojosa W, Rossi MC, Laurino L, *et al.* Progressive disseminated histoplasmosis among human immunodeficiency virus-infected patients from West-Africa: report of four imported cases in Italy. *Infez Med* 2011;19:49-55.
32. Loulergue P, Bastides F, Baudouin V, *et al.* Literature review and case histories of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* infections in HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1647-1652.
33. Blumer S, Kaufman L. Variation in enzymatic activities among strains of *Histoplasma capsulatum* and *Histoplasma duboisii*. *Sabouraudia* 1968;6:203-206.
34. Sharmin S, Ohori A, Sano A, *et al.* *Histoplasma capsulatum* variety *duboisii* isolated in Japan from an HIV-infected Ugandan patient. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2003;44:299-306.
35. 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.
36. McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW, Vilgalys R. The search for the fungal tree of life. *Trends Microbiol* 2009;17:488-497.
37. Kasuga T, Taylor JW, White TJ. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol* 1999;37:653-663.
38. Muniz MM, Sousa CN, Evangelista Oliveira MM, *et al.* Sexual variability in *Histoplasma capsulatum* and its possible distribution: what is going on? *Rev Iberoam Micol* 2014;31:7-10.



7. Discusión



Pese a que durante los últimos años se han producido importantes avances en el diagnóstico y el tratamiento de las micosis oportunistas, la mortalidad y morbilidad de las neumonías fúngicas sigue siendo un problema de primer orden en el paciente inmunodeprimido (Mulanovich VE y Kontoyiannis DP, 2011; Smith JA y Kauffman CA, 2012). El desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico e identificación es una prioridad en la actualidad debido, fundamentalmente, a las limitaciones que presentan los métodos convencionales. Ensayos recientemente desarrollados, basados en la detección de ADN mediante qPCR, la secuenciación de ADN u otros basados en la comparación de perfiles proteicos como la EM MALDI-ToF, han mostrado buenos resultados y actualmente se utilizan para complementar a los métodos convencionales. Sin embargo, se necesitan más estudios que evalúen la eficacia de estos nuevos métodos para lograr su implantación con garantías en los laboratorios de microbiología clínica, pudiendo ser ampliamente utilizados en la rutina diagnóstica (Halliday CL *et al.*, 2015).

El Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología (CNM) es el laboratorio de referencia del Sistema Nacional de Salud (SNS) para el estudio de las infecciones fúngicas humanas. Una de las principales líneas de investigación de este laboratorio está basada en la mejora del diagnóstico y la identificación de las infecciones fúngicas. A lo largo de estos últimos años se han ido desarrollando técnicas de qPCR para la detección de especies fúngicas a partir de la muestra clínica del paciente. Algunas de estas técnicas se han transferido a diferentes hospitales del SNS y otras se han patentado. La experiencia del laboratorio en el uso de la tecnología EM MALDI-ToF es más limitada debido a que no se dispone de equipos de este tipo en las instalaciones del CNM, por lo que se requiere de la colaboración de otros laboratorios.

Los cuatro trabajos, incluidos en esta tesis, quedan englobados en un amplio objetivo que persigue el desarrollo de herramientas rápidas de diagnóstico e identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas con alta especificidad y sensibilidad, lo que supondrá un adelanto en el establecimiento de una terapia antifúngica adecuada y, por tanto, la disminución de la morbilidad y mortalidad asociadas a este tipo de infecciones.

7.1. NUEVA PCR PANFÚNGICA EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONÍAS OPORTUNISTAS Y OTRAS MICOSIS.

Los métodos moleculares basados en la PCR de tipo panfúngico han demostrado ser de gran utilidad cuando no existe una sospecha clara sobre la especie de hongo involucrada en la infección, permitiendo la detección de un amplio rango de especies fúngicas (Khot PD y Fredricks DN, 2009).

El Servicio de Micología cuenta, actualmente, con una qPCR panfúngica acreditada por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) bajo la norma UNE-EN ISO 15189. Esta técnica está basada en la utilización de cebadores universales dirigidos a una región del ADNr de los hongos y la posterior secuenciación del fragmento amplificado para identificar la especie causante de la infección (Buitrago MJ *et al.*, 2013a). En la literatura existen numerosos ejemplos de técnicas similares, aunque la mayoría están basadas en la PCR convencional y difieren en las dianas, el tipo de muestras utilizadas o la población de pacientes incluida en el estudio (Babouee Flury B *et al.*, 2013; Babouee Flury B *et al.*, 2014; Lass-Flörl C *et al.*, 2013; Lau A *et al.*, 2007; Sidiq F *et al.*, 2016; Sugawara Y *et al.*, 2013; Trubiano JA *et al.*, 2016; Vollmer T *et al.*, 2008). En general, todos estos estudios coinciden en que la disminución del tiempo de respuesta, frente a los métodos convencionales, es un claro indicador del potencial de la técnica para disminuir la morbilidad y mortalidad de las infecciones fúngicas y que la técnica es especialmente útil cuando el cultivo resulta negativo. Sin embargo, la necesidad de secuenciar el fragmento amplificado, además de implicar un retraso en el diagnóstico, puede ser una limitación importante en los laboratorios que no dispongan de este tipo de tecnología.

En este trabajo se diseñó una nueva qPCR panfúngica, basada en la combinación de distintas metodologías, con el objetivo final de evitar la secuenciación del fragmento amplificado y, de este modo, reducir el tiempo de respuesta. También se pretendía mejorar la eficiencia del ensayo, ya que estudios previos demostraron la existencia de un sesgo en las especies que puede detectar la técnica debido, posiblemente, a discrepancias o *missmatches* en los cebadores universales (Bellemain E *et al.*, 2010; Buitrago MJ *et al.*, 2013a).

El diseño de la nueva qPCR panfúngica es complejo y se llevó a cabo en dos fases:

i) En primer lugar, se realizó un análisis *in silico* de un gran número de secuencias de diferentes especies de hongos incluidas a la base de datos del Servicio de Micología, con el objetivo de mejorar los cebadores universales y diseñar sondas moleculares para detectar diferentes grupos de especies fúngicas. En base al estudio de estas secuencias se realizó un nuevo diseño del cebador universal ITS2, introduciendo dos posiciones degeneradas para aumentar la eficiencia del ensayo. Esto se vio reflejado en la mejora de la detección de las muestras de mucormicosis respecto a la qPCR panfúngica anterior (73% vs. 55%), en la que se habían obtenido resultados de qPCR negativos y cultivos positivos en este tipo de muestras (Buitrago MJ *et al.*, 2013a). Las sondas moleculares elegidas para el desarrollo de la técnica fueron de tipo *molecular beacon*, ya que proporcionan una alta especificidad debido a su pequeño tamaño y a sus propiedades termodinámicas que evitan, además, la fluorescencia residual (Espy MJ *et al.*, 2006). Estas sondas se diseñaron mediante el programa informático *Beacon Designer 7.0* (Premier Biosoft, EEUU) y en base a la región ITS1 del ADNr, donde se seleccionaron zonas que presentaban suficiente especificidad para diferenciar entre distintos grupos de especies. El objetivo inicial era cubrir el mayor número de especies pero, debido al complejo diseño y a las limitaciones del equipo de qPCR, finalmente se diseñaron cinco sondas en total, todas ellas dirigidas a detectar especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas: tres a nivel de género (*Aspergillus* spp., *Mucor* spp. y *Coccidioides* spp.), una para detectar dos especies del género *Rhizopus* (*R. arrhizus* (antiguamente *R. oryzae*) y *R. microsporus*) y otra para detectar tres especies causantes de micosis endémicas (*H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*) (Figura 7.1). Si bien no se consigue un diagnóstico a nivel de especie, estos resultados permiten guiar el tratamiento hacia un grupo de hongos concreto, lo que adelantaría el establecimiento de la terapia antifúngica. Además, sería posible aplicar otro tipo de técnicas diagnósticas rápidas enfocadas al grupo de hongo identificado (estudio de las curvas de fusión generadas, qPCR específicas, detección de antígeno, etc.) evitando, de este modo, la secuenciación. En nuestro trabajo se consiguió identificar el género o el grupo de especie causante de la infección en el 77,8% de las muestras de aquellos pacientes con infecciones fúngicas reconocidas por las sondas diseñadas.

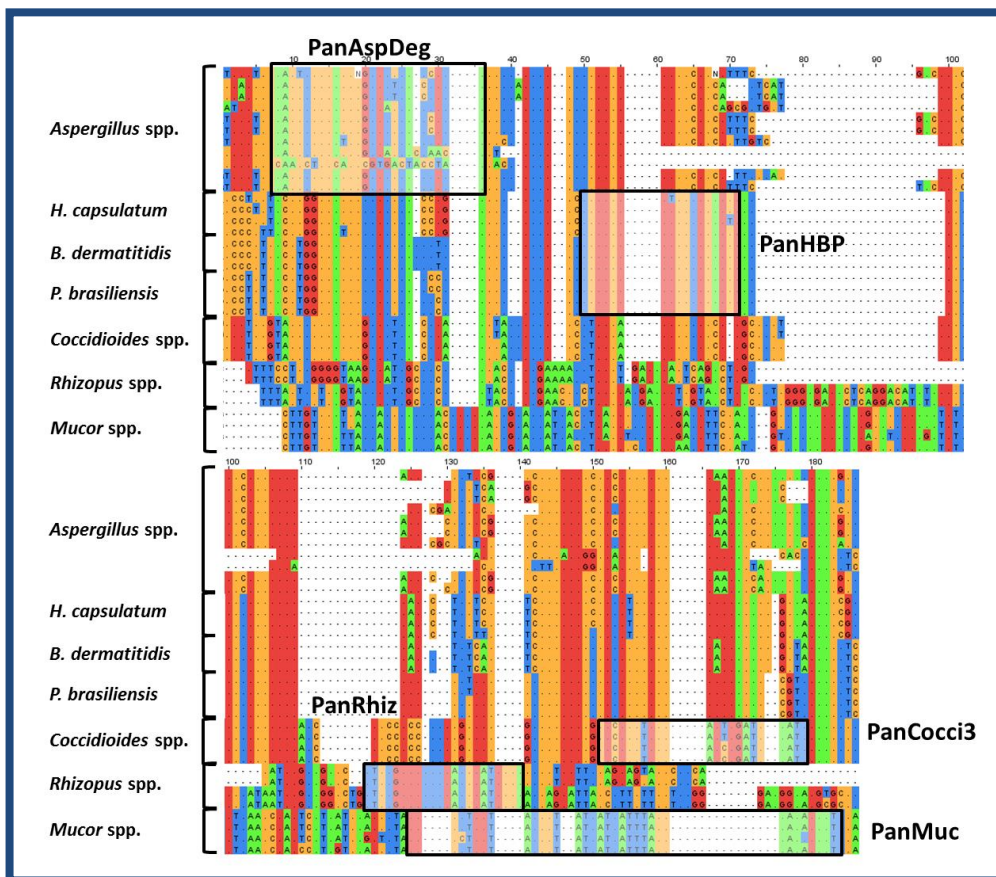


Figura 7.1. Alineamiento de secuencias de distintas especies fúngicas que muestra las regiones seleccionadas para el diseño de las sondas *molecular beacon* en la región ITS1 del ADNr.

ii) Además, debido a que en este diseño también se utilizó un agente intercalante para la detección de ADN fúngico, se puso a punto un paso final de análisis de curvas de fusión y se generó una base de datos con las curvas pertenecientes a las especies incluidas en el proceso de estandarización. Durante la validación, las curvas de fusión obtenidas del análisis de las muestras clínicas se compararon con las de la base de datos, permitiendo la identificación a nivel de especie. Este paso elimina la necesidad de secuenciar el fragmento amplificado, tal y como se ha descrito en otros estudios (Bezdicsek M *et al.*, 2016; Somogyvari F *et al.*, 2012), y que, en nuestro caso, se ve traducido en una reducción del tiempo de respuesta (24 horas vs. 120 horas) respecto a la qPCR panfúngica anterior (Buitrago MJ *et al.*, 2014) (**Figura 7.2**). En este trabajo se consiguió identificar, a nivel de especie, el 67,8% de las muestras con identificación positiva mediante sondas y otras tres, en las que las especies causantes de la infección no estaban cubiertas por ellas, evitando así la secuenciación.

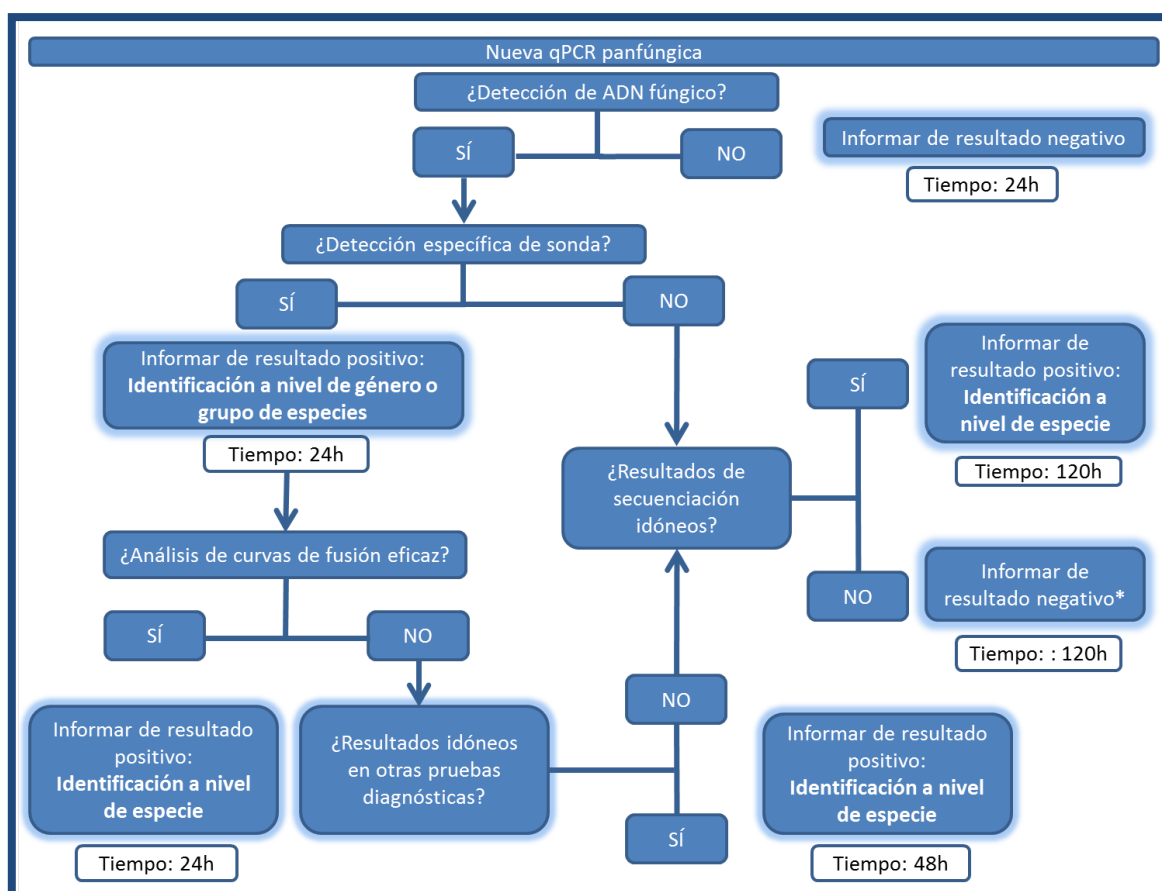


Figura 7.2. Esquema de los procesos y el tiempo de respuesta asociado de la nueva qPCR panfúngica. *con la excepción de las muestras en las que la especie o el género se haya detectado mediante sonda, las cuales se volverán a incluir en el ensayo o se pedirá una nueva muestra.

Esta técnica presenta la novedad de combinar un agente intercalante con sondas moleculares en el mismo tubo. El uso de esta metodología poco común, unido a la complejidad del diseño *in silico*, conlleva una importante estandarización previa para conseguir que ambas químicas funcionen simultáneamente y con la misma intensidad.

A pesar de los buenos resultados de especificidad (100%), reproducibilidad (coeficiente de variación (CV)<5%; coeficiente de determinación (R²)>0,95) y sensibilidad (83,3%) globales, la técnica descrita presenta algunas limitaciones. En primer lugar, el equipo de qPCR dispone de una serie de canales de detección limitados, obligando a restringir el diseño de sondas a tres grupos de hongos e imposibilitando la inclusión de un control interno, necesario para la detección de la inhibición de la amplificación y que, además, es uno de los requisitos de las guías MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*). Tampoco se pudo incluir la detección mediante sonda de algunos grupos de hongos importantes como, por ejemplo, las

levaduras. Este problema puede solventarse dirigiendo el diseño de las sondas al grupo de especies fúngicas de interés, adaptando así la técnica a las necesidades concretas de cada laboratorio. Otra limitación radica en el hecho de que ciertas especies de hongos poco comunes no estaban representadas en la base de datos de curvas de fusión creada y que otras presentaron curvas muy similares, lo que imposibilitó la correcta identificación de algunas especies (**Figura 7.3**; panel inferior derecha). Esto implica que son necesarios experimentos adicionales que permitan ampliar el rango de especies incluidas en esa base de datos. Aun así, y puesto que el número de especies fúngicas capaces de causar infección en humanos no deja de aumentar, siempre existirán casos en los que sea necesario secuenciar y, por tanto, el tiempo de respuesta sea mayor.

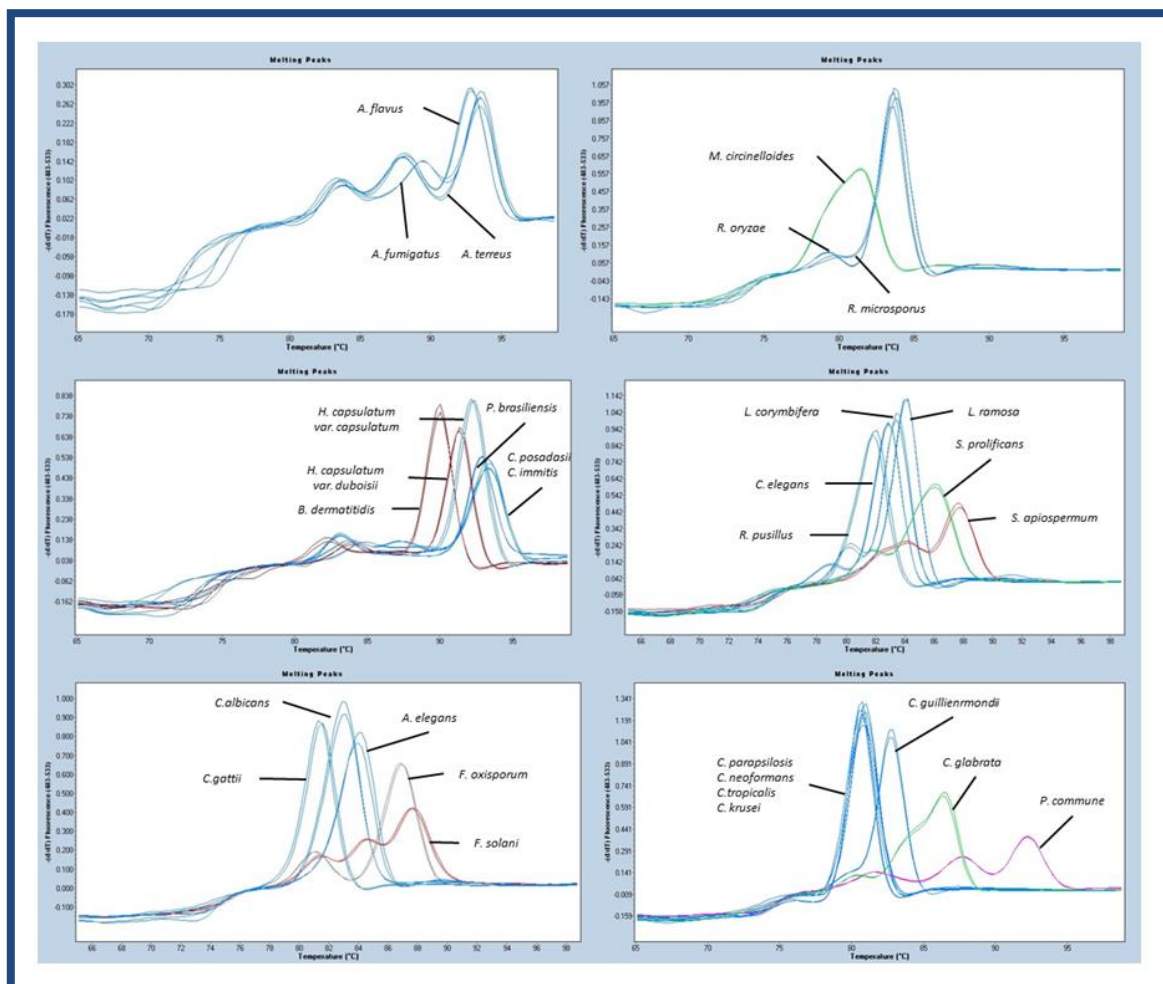


Figura 7.3. Curvas de fusión de las especies fúngicas incluidas en la base de datos construida para la identificación a nivel de especie en la nueva qPCR panfúngica.

En cuanto a los factores que pudieron causar resultados falsos negativos (16,7%), destacamos algunos como: i) la presencia de una baja carga fúngica en las muestras, ii) la

utilización de muestras almacenadas durante mucho tiempo, iii) la coexistencia de varias especies en la misma muestra o iv) la presencia de inhibidores, ya que la mitad de estos falsos negativos fueron biopsias parafinadas, las cuales se han relacionado con fenómenos de inhibición (Babouee Flury B *et al.*, 2014). Por otra parte, una de las limitaciones señaladas por otros estudios similares es la posible detección de falsos positivos (Lass-Flörl C *et al.*, 2013; Trubiano JA *et al.*, 2016). Sin embargo, esto no ocurrió en nuestro estudio, ya que no se describió ningún caso con discrepancias entre la especie causante de la infección y la detectada por la qPCR. Finalmente, respecto al tipo de muestra utilizada, la mayoría fueron biopsias, aunque también se analizaron otro tipo de muestras con excelentes resultados. Sin embargo, son necesarias validaciones adicionales, en otro tipo de muestras menos invasivas, para corroborar estos resultados.

Este tipo de técnicas moleculares de carácter panfúngico son esenciales hoy día debido al cada vez más amplio espectro de hongos patógenos que causan infección en el paciente inmunocomprometido, lo que se traduce en que no se puedan identificar evidencias concretas sobre la especie involucrada en la infección hasta en un 30%, según algunos estudios recientes (Buitrago MJ *et al.*, 2014). En resumen, la nueva técnica diseñada es específica y abierta a modificaciones y permite un ahorro de tiempo de hasta 96 horas, disminuyendo de forma drástica del tiempo de respuesta en el diagnóstico de neumonías fúngicas oportunistas, en particular, e infección fúngica, en general, en muestras de biopsias.

7.2. PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA NEUMOCISTOSIS: UTILIDAD PARA DIFERENCIAR POBLACIONES DE PACIENTES

La cuantificación precisa de la carga de *P. jirovecii* en las muestras de los pacientes y el establecimiento e interpretación de los puntos de corte, para diferenciar el tipo de infección, es el principal reto del diagnóstico de la PCP. Sin embargo, las técnicas clásicas de diagnóstico por microscopía muestran una baja sensibilidad en los pacientes colonizados debido a la baja carga fúngica asociada, por lo que se requiere de otros métodos más eficientes como la PCR (Morris A y Norris KA, 2012). Se han propuesto distintos puntos de corte en base a la carga fúngica determinada por la qPCR, pero aún no

se ha establecido ningún valor de consenso (Alanio A *et al.*, 2016b). Algunos autores sugieren que se deben definir dos puntos de corte complementarios: uno para establecer el diagnóstico de la PCP y otro para excluirlo (Alanio A *et al.*, 2011b; Fillaux J *et al.*, 2008; Maillet M *et al.*, 2014). Esto implica que las muestras que quedan en la zona gris entre los dos valores requerirán un análisis más profundo recurriendo a otras técnicas diagnósticas y a los datos clínicos del paciente. Una de las dianas más utilizadas para cuantificar la carga del hongo en los pacientes es el gen que codifica la subunidad mayor del ARN ribosómico mitocondrial (*mtLSU rRNA*). No obstante, el número de copias exactas del genoma mitocondrial en comparación con el genoma nuclear no ha sido convenientemente investigado.

La reclasificación de *P. jirovecii* de parásito a hongo (Edman JC *et al.*, 1988) ha sido la causa de la ausencia de herramientas diagnósticas para esta micosis respiratoria en el Servicio de Micología. Recientemente, se ha desarrollado una qPCR en formato múltiple, que detecta tres especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas (*P. jirovecii*, *H. capsulatum* y *Cryptococcus spp.*) y está incluida en la cartera de servicios del laboratorio (Gago S *et al.*, 2014b). La diana molecular elegida para la detección de *P. jirovecii* fue la región ITS del ADNr que, en este hongo, es unicopia (Nahimana A *et al.*, 2000). Puesto que la técnica estaba dirigida a pacientes VIH positivos, los cuales presentan mayor carga fúngica que los pacientes con otro tipo de inmunosupresión (Louis M *et al.*, 2015), la técnica se pudo validar con una buena sensibilidad en pacientes con infección probada. Sin embargo, esta diana no sería la más conveniente para pacientes colonizados, en estadios iniciales o con una inmunosupresión distinta, ya que está descrito que la sensibilidad de la técnica es menor cuando se emplean dianas unicopia (Montesinos I *et al.*, 2015; Robberts FJ *et al.*, 2007; Tamburrini E *et al.*, 1996b).

En el estudio incluido en esta tesis se utilizó la qPCR para establecer una cuantificación relativa de cuatro genes mitocondriales de *P. jirovecii* (*mtLSU rRNA*, *mtSSU rRNA*, *NAD1* y *CYTB*), respecto a dos genes nucleares unicopia (*DHPS* y *HSP70*), en LBA de una cohorte de 84 pacientes del hospital *Saint Louis* en París (Francia) que presentaban distintos estadios de la infección. Además, se evaluaron los resultados de la técnica de la inmunofluorescencia (IF), la qPCR (Alanio A *et al.*, 2011b) y el diagnóstico clínico final (PCP vs. colonización) para cada uno de los pacientes incluidos en el estudio.

El análisis retrospectivo de la carga fúngica, establecida mediante qPCR, frente a la técnica de la IF mostró amplias zonas de datos superpuestos indicando que el resultado de la técnica de la IF no refleja adecuadamente la carga fúngica del hongo en los LBA. Esto puede ser debido a problemas técnicos intrínsecos al ensayo, pero también a la variación del ratio de formas tróficas y quísticas del hongo debido al tratamiento (Tamburrini E *et al.*, 1996a), ya que el ensayo de la IF utilizado en el estudio (*Monofluo kit Pneumocystis, Bio-Rad*, Francia) solo revela las formas quísticas del hongo. Por otro lado, se observó que el diagnóstico final clínico no estaba ligado a la carga fúngica de las muestras y que tampoco permitía discriminar adecuadamente entre las distintas categorías. Para entender esto hay que considerar que la decisión final del facultativo no está basada solo en los resultados de las pruebas microbiológicas sino que, además, tiene en cuenta otros factores relacionados con el paciente y depende en gran medida de su experiencia, por lo que tiene un gran componente subjetivo. Estos resultados sugieren que el establecimiento de la carga fúngica en muestra clínica, en términos de cuantificación mediante qPCR, sería el criterio más objetivo para la diferenciación entre colonización e infección activa por *P. jirovecii*, ya que las superposiciones de los datos de la técnica de la IF y del diagnóstico clínico final, descritas anteriormente, impiden el establecimiento de puntos de corte para diferenciar entre ambas fases de la infección como se ha descrito, previamente, en otros estudios (Montesinos I *et al.*, 2015).

La cuantificación de las dianas mitocondriales desarrollada en este estudio se realizó calculando el número de copias relativo de dichas dianas mediante seis ensayos de qPCR y siguiendo métodos y algoritmos propuestos con anterioridad en otros estudios (Pfaffl MW, 2001; Vandesompele J *et al.*, 2002). Brevemente, el método consistió en calcular el ratio, expresado en ciclos de amplificación o cuantificación (*Cq, Cycle of Quantification*), entre cada gen mitocondrial y la media geométrica de los dos genes nucleares unicopia. Mediante este método, se observó que las dianas mitocondriales presentaban distinto número de copias, siendo *mtSSU rRNA* el gen más representado con una mediana de 37 copias por genoma nuclear, seguido de *NAD1* con 23 copias, *mtLSU rRNA* con 15 copias y *CYTB*, en último lugar, con 6 copias. El hallazgo de esta variabilidad genética resulta llamativo ya que se ha descrito que el genoma mitocondrial de *P. jirovecii* es circular, al contrario que en otras especies relacionadas como *P. carinii* y *P. murina* donde es lineal (Ma L *et al.*, 2013), por lo que se esperaría que cada gen

estuviera presente en el mismo número de copias en comparación con el genoma nuclear. Los resultados obtenidos podrían explicarse entonces si varias “sub-especies” de ADNm coexistieran en el mismo organismo siendo algunas preferentemente amplificadas respecto a otras (Figura 7.4), hipótesis que ya ha sido planteada en otros estudios (Alanio A *et al.*, 2016a).

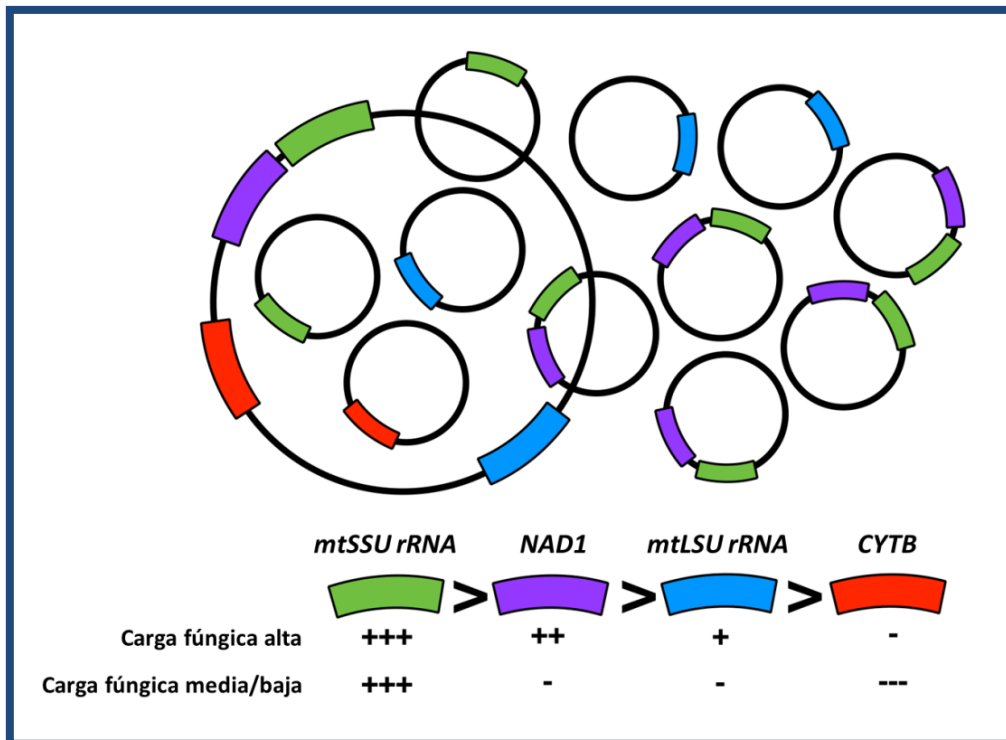


Figura 7.4. Esquema de la dinámica del ADNm de *P. jirovecii*. La “especie” completa de ADNm que contiene todas las dianas coexistiría con varias “sub-especies” que variarían según la fisiología del hongo. La “sub-especie” que contiene las dianas *mtSSU rRNA* y *NAD1* estaría presente en un número de copias mayor que otras “sub-especies”.

Una forma de comprobar esta hipótesis sería mediante la amplificación, clonación y análisis de las regiones situadas entre los genes mitocondriales. Sin embargo, esto no se pudo realizar mediante PCR convencional, bien por la dificultad para obtener grandes fragmentos a partir de muestras complejas, como los LBA, o por el hecho de que las “sub-especies” presenten realmente una configuración lineal.

También se observó que el número de copias de los genes mitocondriales variaba dependiendo de la carga fúngica de las muestras, siendo menor conforme disminuía la misma. Esto permitió, mediante un análisis de agrupamiento jerárquico (HCA, *Hierarchical Clustering Analysis*), definir cinco grupos mayoritarios de muestras, asociados

significativamente a la carga fúngica ($p=0,029$), en los cuales el número de copias de los genes mitocondriales era distinto. Esto podría relacionarse con la hipótesis anteriormente descrita donde una alta carga fúngica estaría relacionada con organismos con una alta tasa de replicación mientras que las cargas fúngicas menores se asociarían con un estado quiescente del hongo, fenómeno que ya ha sido descrito en otras especies fúngicas como *C. neoformans* (Alanio A *et al.*, 2015). La excepción fue el gen *mtSSU rRNA*, cuyo número de copias se mantuvo significativamente constante respecto a la variación de la carga fúngica y, además, se amplificó mediante qPCR en tres muestras negativas para la diana *mtLSU rRNA* (Alanio A *et al.*, 2011b). Esta mayor sensibilidad es debida a que el gen *mtSSU rRNA* está presente alrededor de 2,5 veces más que el gen *mtLSU rRNA*, según los resultados obtenidos en este estudio, lo que podría indicar que se encuentre duplicado en el genoma mitocondrial. Esto sugiere que *mtSSU rRNA* sería la diana molecular más adecuada para la detección y cuantificación de *P. jirovecii* en muestras respiratorias humanas.

Los estudios basados en el análisis de la expresión de los genes incluidos en este trabajo podrán arrojar información complementaria sobre la fisiología del hongo en los distintos estadios de la infección. También es posible que los nuevos proyectos de secuenciación masiva permitan confirmar o descartar esta hipótesis, ya que han conseguido profundizar en el análisis de otras características del hongo como la adaptación al hospedador o la diversidad de las cepas durante la infección (Alanio A *et al.*, 2016a; Ma L *et al.*, 2016). Sin embargo, la ausencia de un método de cultivo artificial eficiente del hongo es la principal limitación de este tipo de estudios.

El estudio de las distintas dianas utilizadas en el diagnóstico molecular de *P. jirovecii* es imprescindible debido a la gran plasticidad genética demostrada en este trabajo. Además, en un estudio multicéntrico reciente se muestran resultados falsos negativos en ensayos de qPCR debidos a mutaciones de una de las dianas más utilizadas (*mtLSU rRNA*), lo que respalda la necesidad de investigación de dianas moleculares alternativas más estables (Le Gal S *et al.*, 2017).

7.3. IDENTIFICACIÓN DE *Histoplasma capsulatum* MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-ToF

En los últimos años la tecnología EM MALDI-ToF ha demostrado ser una herramienta alternativa eficiente para la identificación de microorganismos patógenos. Esta técnica no necesita de personal especializado y permite la reducción de costes y del tiempo de respuesta (Posteraro B *et al.*, 2013). Varios grupos han desarrollado distintos estudios para estandarizar la identificación de las especies de levaduras y hongos filamentosos más comunes (Rizzato C *et al.*, 2015). Sin embargo, existen algunas áreas menos exploradas como la de los hongos endémicos, que no se encuentran representados en ninguna de las bases de datos de perfiles proteicos de referencia de los sistemas comerciales. Recientemente, se han desarrollado ampliaciones de las bases de datos para la identificación de *Paracoccidioides* spp. y *Penicillium marneffe* (Lau SK *et al.*, 2016; Nobrega de Almeida J, Jr *et al.*, 2015).

En este trabajo hemos desarrollado la primera base de datos de referencia de perfiles proteicos para la identificación de *H. capsulatum* utilizando la tecnología EM MALDI-ToF. En esta base de datos se incluyeron seis cepas correspondientes a las tres variedades del hongo y tres de ellas, además, en las dos fases morfológicas del hongo. La validación se realizó en conjunto con otras bases de datos, tanto comerciales como desarrolladas por otros laboratorios, y se emplearon 30 cepas de *H. capsulatum* en fase micelial, de las cuales 14 también se incluyeron en fase levaduriforme. Esta validación se realizó en condiciones similares a las de la práctica clínica habitual en cualquier hospital: se utilizaron medios de cultivo comunes para el crecimiento de hongos y se empleó el método de extracción proteica recomendado por el fabricante. Además, el ensayo se realizó en ciego con dos réplicas de cada cepa. Finalmente, también se incluyó un panel de especificidad con 33 cepas pertenecientes a otras especies fúngicas, entre ellas especies cercanas a *H. capsulatum* como *Coccidioides* spp., *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*.

Casi todas las cepas “no *H. capsulatum*” obtuvieron una puntuación mayor de 1,7, que es el punto de corte que el sistema MALDI Biotyper considera adecuado para la definición de género, y se identificaron correctamente, salvo algunas excepciones a nivel de especie. Además, las cepas de *Coccidioides* spp., *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis* no dieron ningún resultado, ya que no estaban representadas en ninguna de las bases de

datos de referencia. Por tanto, no se describió reactividad cruzada con la base de datos de *H. capsulatum* construida, indicando el alto valor de especificidad obtenido en el ensayo. Por otro lado, todas las cepas de *H. capsulatum* se identificaron correctamente y el 86,6% obtuvieron una puntuación mayor de 1,7. Aunque se repitió la extracción proteica, no se consiguió mejorar los resultados para el del 13,4% restante. En general el trabajo con este hongo fue complicado, ya que el manejo de las cepas se realizó en nivel de contención de tipo III, lo que impidió introducir cambios significativos en las condiciones de cultivo del hongo o en el método de extracción proteica. Por ello, es posible que las bajas puntuaciones, obtenidas para algunos aislados, se deban a que el método de extracción no fue el óptimo para este tipo de hongos. También hay que mencionar que los puntos de corte establecidos por el fabricante han sido considerados por un gran número de autores como muy conservadores para hongos, demostrando que el descenso de estos valores no afecta a la precisión de la técnica (Bader O, 2017; Normand AC *et al.*, 2017). En nuestro caso la puntuación obtenida por los 44 aislados de *H. capsulatum* estaba distribuida alrededor de una media de 1,78, con una desviación estándar de 0,15, y se observó que, al disminuir el punto de corte, la especificidad de la técnica seguía siendo del 100% mientras que la sensibilidad aumentaba considerablemente.

Respecto a los resultados obtenidos con las dos fases morfológicas del hongo, en los experimentos iniciales, se observó que los espectros correspondientes a la fase filamentosa y levaduriforme de la misma cepa eran distintos, lo cual era esperable teniendo en cuenta las diferencias de expresión génica entre ambas fases ya descrita por otros autores (Edwards JA *et al.*, 2013). En el proceso de validación, la mejor puntuación se obtuvo en las formas filamentosas, ya que el 86,6% obtuvo puntuaciones mayores de 1,7 mientras que solo el 50% de las levaduras superó esta puntuación. Además, también hubo cierta reactividad cruzada entre ambas fases, con siete aislados (15,9%) en una fase morfológica reconocidos por la otra fase en la base de datos de referencia. Esto puede ser debido a la dificultad para obtener una conversión completa de la fase micelial en levadura *in vitro*. En este trabajo, a pesar de numerosos intentos, solo se consiguió la conversión de la mitad de las cepas incluidas en el proceso de validación (14 de las 30 cepas totales).

La nueva base de datos de perfiles proteicos creada no permitió discriminar correctamente entre las variedades del hongo, ya que solo el 63,6% de los aislados fueron

reconocidos por cepas de la misma variedad. Este hecho puede explicarse debido a las complejas relaciones filogenéticas entre las distintas variedades del hongo descritas por varios autores, que sugieren que la clasificación tradicional en tres variedades es obsoleta (Kasuga T *et al.*, 2003; Teixeira M de M *et al.*, 2016; Vite-Garín T *et al.*, 2014). La diversidad a nivel del espectro observada en las cepas incluidas en la base de datos de referencia ya nos indicaba que los límites entre las variedades podrían no ser claros (Figura 7.5).

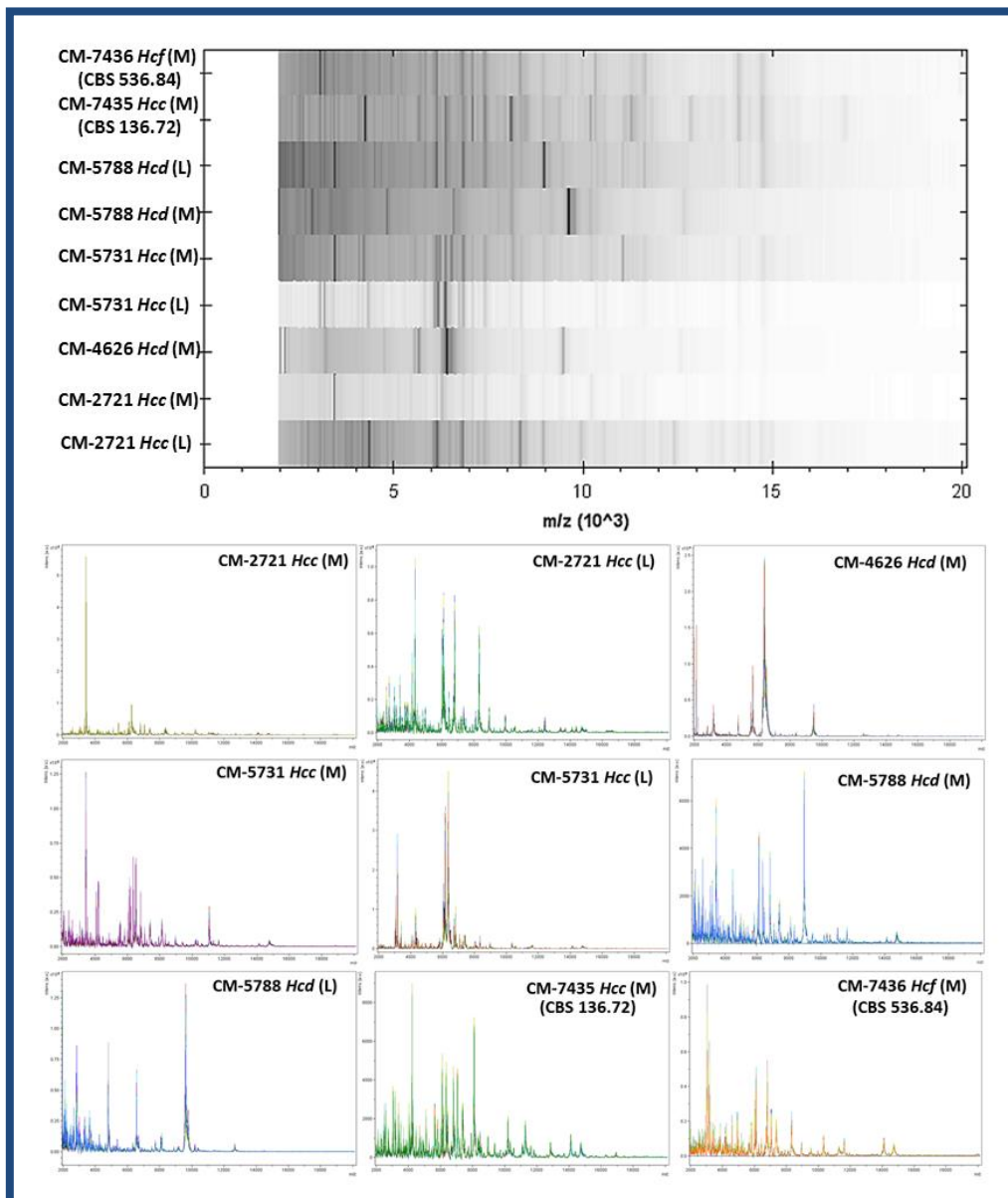


Figura 7.5. Geles virtuales y agrupaciones de espectros de los aislados de *H. capsulatum* incluidos en la base de datos de referencia de perfiles proteicos. *Hcc*: *H. capsulatum* var. *capsulatum*; *Hcd*: *H. capsulatum* var. *duboisii*; *Hcf*: *H. capsulatum* var. *farciminosum*; **M**: Micelio; **L**: Levadura.

Además, el empleo de un método de extracción proteica sub-óptimo pudo disminuir el poder de discriminación de la técnica. En la práctica clínica la identificación de las variedades se considera irrelevante, ya que el tratamiento es el mismo para ambas infecciones (Loulergue P *et al.*, 2007).

Por último, para la validación de la técnica, se han utilizado cultivos del hongo en fase filamentosa de siete días de crecimiento. Esto supone una importante disminución en el tiempo de identificación, respecto a las técnicas convencionales, ya que en estos cultivos todavía no estaban presentes los característicos macroconidios tuberculados que permiten la identificación del hongo mediante microscopía (**Figura 7.6**).

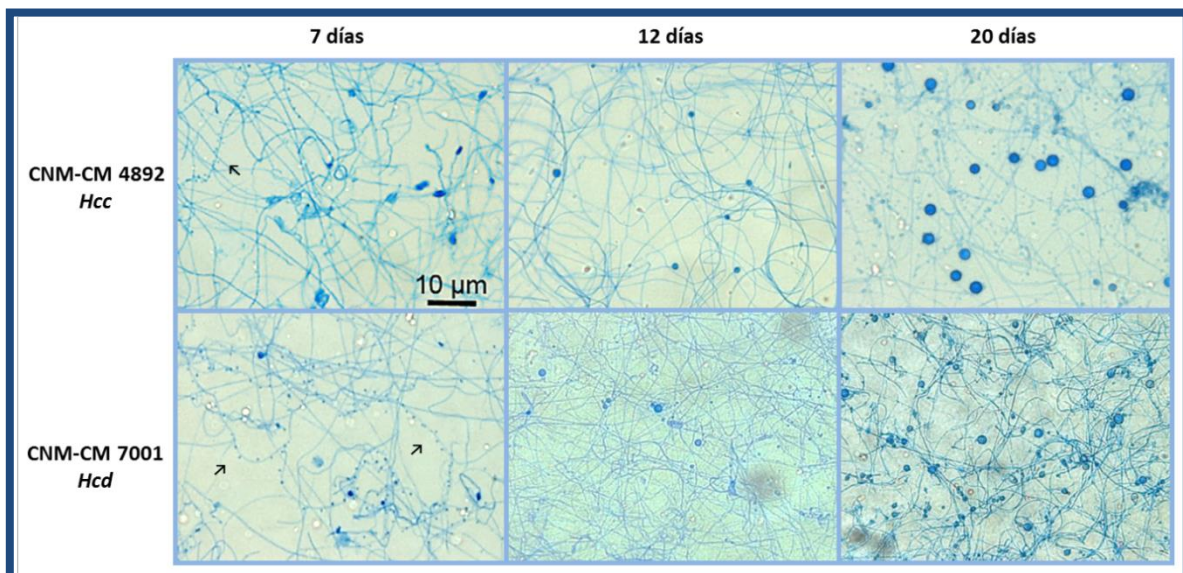


Figura 7.6. Preparaciones microscópicas en azul de lactofenol de dos cepas de *H. capsulatum* a 7, 12 y 20 días de crecimiento incluidas en el proceso de validación de la base de datos de referencias de perfiles proteicos. Las flechas indican las zonas donde empiezan a aparecer lo que serán los macroconidios tuberculados característicos del hongo en fase filamentosa. **Hcc:** *H. capsulatum* var. *capsulatum*; **Hcd:** *H. capsulatum* var. *duboisii*.

En conclusión, la base de datos de referencias de perfiles proteicos construida es consistente y adecuada para la identificación de *H. capsulatum* en ambas fases morfológicas mediante la tecnología EM MALDI-ToF y permitirá adelantar el diagnóstico de la histoplasmosis a partir de cultivo. Además, pese a que el método de extracción proteica utilizado no es el óptimo para este tipo de hongos, la manipulación del hongo es mínima reduciendo el riesgo biológico y, por tanto, la técnica podría adaptarse fácilmente a otros laboratorios con las medidas de contención adecuadas.

7.4. ESTUDIO DE LA HISTOPLASMOSIS AFRICANA EN ZONA NO ENDÉMICA E IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIEDADES PATÓGENAS DE *Histoplasma capsulatum*

La histoplasmosis está causada por el hongo dimórfico *H. capsulatum*, del que se han descrito dos variedades patógenas para el ser humano que coexisten en África: *H. capsulatum* var. *capsulatum* y *H. capsulatum* var. *duboisii*.

Histoplasma capsulatum var. *duboisii* es el agente causal de la histoplasmosis africana en sentido estricto, la cual está limitada a las regiones del centro y oeste de África Subsahariana y Madagascar (Bahr NC *et al.*, 2015). Con el aumento de la inmigración y los viajes, la incidencia de la histoplasmosis ha aumentado en Europa en los últimos años (Martin-Iguacel R *et al.*, 2014). Sin embargo, la diferenciación de la variedad causante de la infección no se suele realizar, ya que los métodos tradicionales de identificación de las variedades están anticuados y la información, respecto a las manifestaciones clínicas de la infección, está recogida en artículos antiguos y no se ha revisado últimamente (Gugnani HC, 2000; Gugnani HC y Muotoe-Okafor F, 1997). Además, se considera que la identificación de las variedades es irrelevante a nivel clínico, ya que ambas infecciones se tratan de la misma manera (Loulergue P *et al.*, 2007), aunque algunos autores destacan que la variedad africana puede ser resistente al itraconazol, segunda línea de tratamiento de la histoplasmosis (Kashif M *et al.*, 2015). Cuando se realiza la identificación de las variedades, esta se basa en el tamaño de las levaduras observadas mediante técnicas histopatológicas y en la secuenciación de ADN y posterior comparación con las bases de datos de secuencias, donde *H. capsulatum* var. *duboisii* se encuentra poco representada (Murata M *et al.*, 2007; Tsiodras S *et al.*, 2012; Zida A *et al.*, 2015).

En el Servicio de Micología existe una técnica de qPCR destinada al diagnóstico de la histoplasmosis en muestra clínica (Buitrago MJ *et al.*, 2006). Esta qPCR está diseñada para amplificar una región de la diana ITS1 donde no existen diferencias, a nivel de secuencia, que permitan la distinción de las variedades del hongo. También se realiza identificación molecular a partir del hongo aislado en cultivo, mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS completa del ADNr. Sin embargo, las diferencias a nivel de secuencia son insuficientes para diferenciar ambas variedades de forma concluyente. A esto se suma que la cantidad de cepas de *H. capsulatum* var. *duboisii* en colecciones internacionales es muy limitada y ninguna de ellas está considerada como la cepa “tipo” o

de referencia. Por ello, la identificación de una cepa africana ha sido siempre un problema al que debíamos dar solución. Pese al limitado número de pacientes y cepas clínicas procedentes de África que se han incluido en el estudio, este es el primer trabajo que analiza los casos de pacientes africanos con histoplasmosis fuera de zona endémica y estudia la variabilidad genética de las cepas aisladas de estos pacientes, junto a otras cepas pertenecientes a colecciones nacionales e internacionales.

La mayoría de los pacientes de este estudio procedían de África Subsahariana y, casi todos ellos (10 de 13), presentaban inmunodeficiencia debida a SIDA y enfermedad diseminada. Además, tres pacientes mostraron lesiones cutáneas y un paciente inmunocompetente presentó un cuadro clínico pulmonar localizado. Estos datos clínicos contradecían lo que se sabía hasta el momento, ya que está descrito que *H. capsulatum* var. *duboisii* está poco asociado a SIDA y tiene tropismo por piel y huesos (Gugnani HC, 2000; Gugnani HC y Muotoe-Okafor F, 1997). De estos pacientes africanos, se aislaron un total de cinco cepas que se analizaron junto con otras cepas clínicas correspondientes a las dos variedades, así como cepas de colecciones internacionales.

Para la identificación de las variedades de *H. capsulatum* se utilizaron, en primer lugar, métodos tradicionales:

i) Se realizó la prueba de la ureasa debido a que, tradicionalmente, *H. capsulatum* var. *capsulatum* se ha considerado positivo para esta prueba y *H. capsulatum* var. *duboisii* negativo (Coremans J, 1963). Sin embargo, todas las cepas incluidas en el estudio resultaron ser ureasa positivas, lo que indica la invalidez de esta prueba, como ya habían señalado otros autores previamente (Blumer S y Kaufman L, 1968; Sharmin S *et al.*, 2003).

ii) Se midió el tamaño de las levaduras de 14 de las cepas incluidas en el estudio mediante citometría de flujo. Está descrito que las levaduras de *H. capsulatum* var. *duboisii* presentan mayor tamaño (6-12 μm) que las de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (2-4 μm) (Wheat LJ *et al.*, 2016) y, por tanto, la identificación definitiva de las variedades del hongo se ha estado basando en este carácter durante muchos años. Sin embargo, no se encontró una diferencia significativa, relativa al tamaño de las levaduras, entre los dos grupos, lo que apoyaba nuestras observaciones mediante microscopía (**Figura 7.7**). Este análisis se realizó *in vitro* y bajo unas condiciones de cultivo concretas, por lo que se necesitan más estudios para corroborar estos resultados, aunque queda patente la heterogeneidad del tamaño de las células.

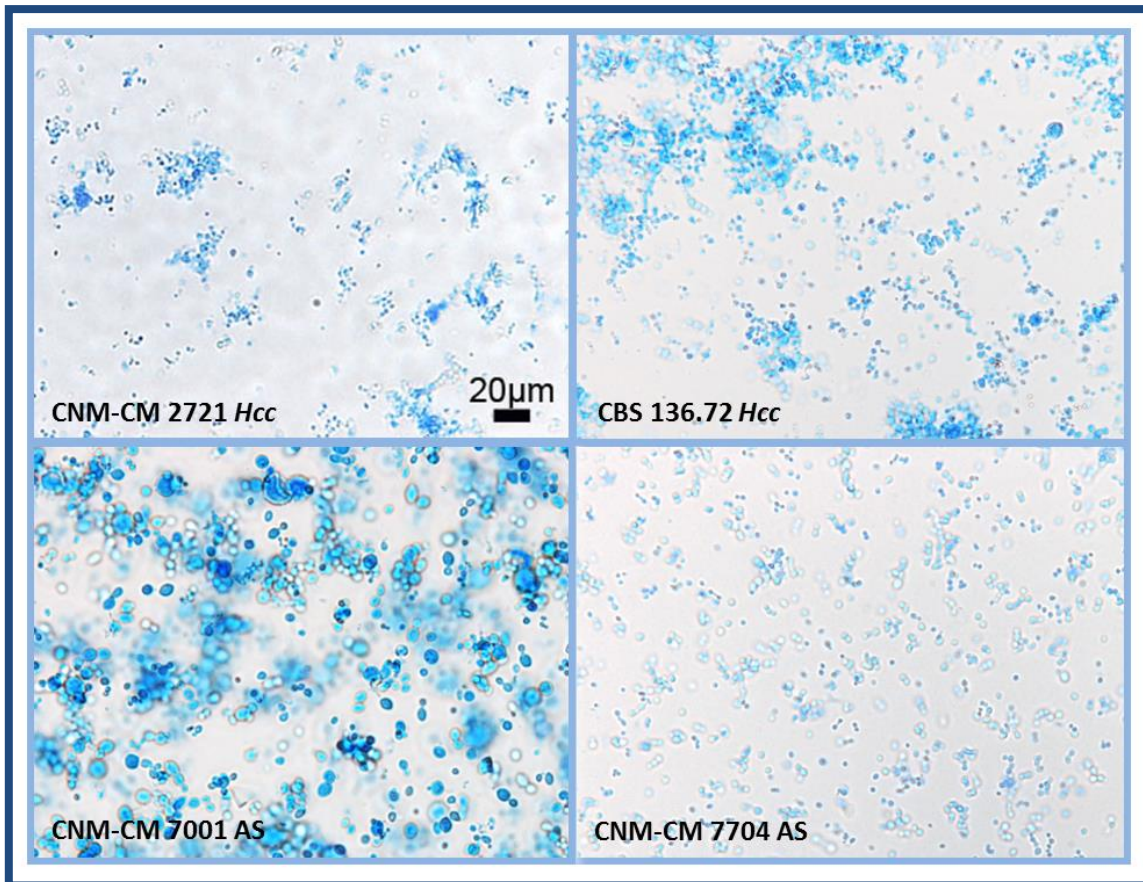


Figura 7.7. Preparaciones microscópicas en azul de lactofenol de cepas de *H. capsulatum* en fase levaduriforme que muestran distintos tamaños de células. *Hcc*: *H. capsulatum* var. *capsulatum*; *AS*: cepas africanas (*African strains*).

Después se llevó a cabo un MLSA basado en la amplificación, secuenciación y posterior análisis de tres dianas moleculares: i) la región completa del ADNr ITS1-5.8S-ITS2-D1D2, que incluye tres zonas variables de interés y es considerada el “código de barras” genético o *barcoding* para la identificación de hongos (Schoch CL *et al.*, 2012); ii) el gen *RPB1*, que ha sido descrito como alternativa a las dianas de ADNr y se ha utilizado en proyectos como el AFToL (*Assembling the Fungal Tree of Life*) (McLaughlin DJ *et al.*, 2009) y iii) el gen *OLE*, que proporciona información sobre la distribución geográfica de *H. capsulatum* (Kasuga T *et al.*, 1999). Combinando la información genética de las tres dianas en un mismo análisis filogenético se definió un grupo, con alto valor estadístico (96% de valor de remuestreo o *bootstrap*), que contenía todas las cepas africanas. Sin embargo, también la cepa *H. capsulatum* var. *capsulatum* de origen africano (CBS 287.54) quedaba incluida en este grupo, indicando su relación genética con el resto de cepas africanas e impidiendo la diferenciación de las variedades del hongo.

Por último, también se identificó el tipo sexual de todas las cepas mediante métodos moleculares. Se obtuvo un ratio cerca de 1:1, al contrario de lo descrito en otros estudios donde el tipo sexual *MAT1-2* resultó predominante (Muniz MM *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta la clasificación de los aislados, aunque en las cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* se observó una distribución idéntica de los dos tipos sexuales, en las cepas africanas el tipo sexual *MAT1-2* era mayoritario con un ratio de 3:1. Al estudiar la secuencia de la diana *MAT1* en sendos análisis filogenéticos para cada tipo sexual, también se definieron grupos con alto valor estadístico donde se incluían las cepas africanas. De nuevo, la cepa CBS 287.54 quedaba incluida en el grupo de cepas africanas, al igual que en el análisis filogenético anterior. No podemos descartar el hecho de que esta cepa se identificara erróneamente en el momento de su colección, pero no se disponen de más datos sobre ella (<http://www.cbs.knaw.nl/>). Esta es la primera vez que se utilizan métodos moleculares para identificar el tipo sexual de cepas africanas de *H. capsulatum*, por lo que son necesarios más estudios para confirmar estos resultados.

En resumen, ni los criterios clínicos tradicionales sobre la histoplasmosis africana ni los métodos convencionales de identificación utilizados fueron útiles para la diferenciar las variedades de *H. capsulatum*. Por otra parte, los métodos moleculares llevados a cabo permitieron agrupar todas las cepas africanas en un solo grupo, incluyendo la cepa clasificada como *H. capsulatum* var. *capsulatum*, lo que sugiere que la clasificación tradicional del hongo en tres variedades podría ser incorrecta, como describen varios autores (Kasuga T *et al.*, 2003; Teixeira M de M *et al.*, 2016; Vite-Garín T *et al.*, 2014). Por último, la caracterización del tipo sexual reveló una distribución desigual de este carácter en las cepas africanas.

El estudio de la histoplasmosis africana, tanto dentro como fuera de zona endémica, es esencial para definir la epidemiología y patogenicidad de esta infección. Sin embargo, con frecuencia, la identificación de *H. capsulatum* se basa en los métodos tradicionales, pudiendo llevar a conclusiones equivocadas. Esto se observa en algunos estudios donde se habla de presentaciones clínicas atípicas basándose, exclusivamente, en el tamaño de la levadura (Mathews DM *et al.*, 2016). Por último, es importante establecer límites claros entre las variedades o subgrupos del hongo que sirvan de referencia para futuros trabajos y que permitan explorar las características de una infección fúngica tan importante como es la histoplasmosis.

7.5. APLICACIÓN DE LOS RESULTADOS Y PERSPECTIVAS

Como ya se ha indicado, una de las líneas de investigación del Servicio de Micología del CNM se basa en el desarrollo y validación de nuevos métodos de diagnóstico e identificación de las especies fúngicas causantes de infecciones en humanos. Este trabajo de tesis se engloba dentro de este proyecto y está enfocado a la mejora de las técnicas ya existentes en el laboratorio y al desarrollo de nuevos métodos para el diagnóstico de infecciones respiratorias causadas por hongos.

Respecto a la mejora de los métodos ya existentes, se ha desarrollado una nueva técnica de qPCR panfúngica debido a que la empleada actualmente presenta desviación en la eficiencia de amplificación de algunas especies fúngicas y un tiempo de respuesta limitado. Sin embargo, es una técnica muy demandada por los hospitales del SNS, ya que es de gran utilidad en aquellos casos en los que no existe una clara sospecha del hongo implicado en la infección. La nueva qPCR desarrollada presenta un diseño muy complejo, pero permite reducir considerablemente el tiempo de respuesta y evitar el sesgo detectando todas las especies con la misma eficiencia. Los resultados de este trabajo se han publicado y, actualmente, se está preparando la inclusión de la técnica en la cartera de servicios del laboratorio reemplazando a la anterior.

En la misma línea de trabajo se ha realizado una colaboración con el Dr. Alexandre Alanio del Departamento de Micología y Parasitología del Hospital *Saint Louis* en París (Francia), con el objetivo de establecer el número de copias de las dianas mitocondriales respecto al genoma nuclear del hongo *P. jirovecii*. Con los resultados obtenidos de este estudio, se ha abierto una puerta al desarrollo de una técnica que permita diferenciar fácilmente las poblaciones de pacientes en distintos estadios de la infección. Este trabajo ya se ha publicado y en el futuro se establecerán nuevas colaboraciones con el Dr. Alexandre Alanio para seguir mejorando las herramientas diagnósticas en la PCP.

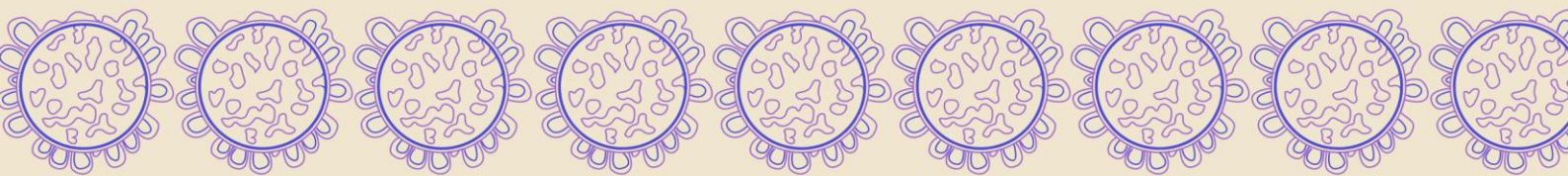
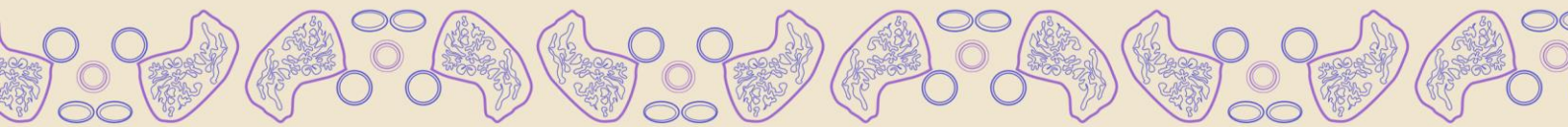
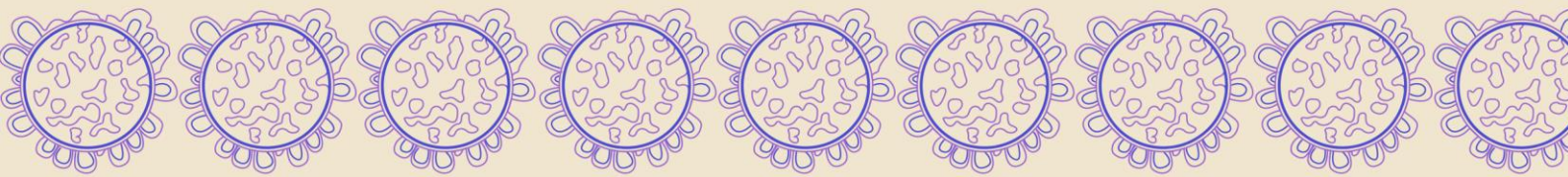
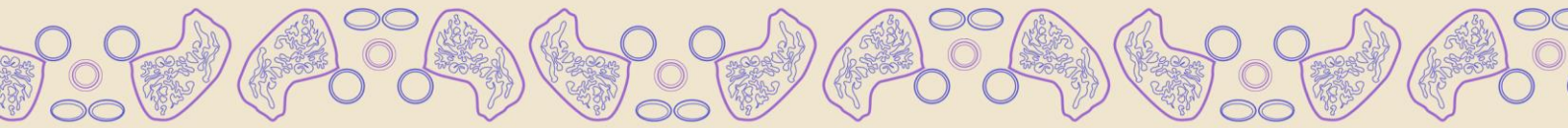
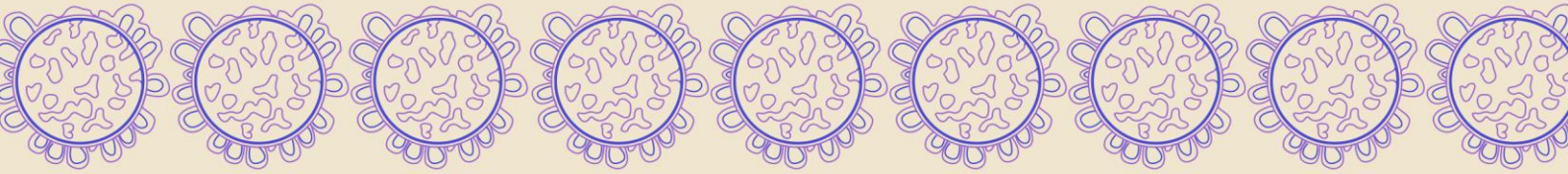
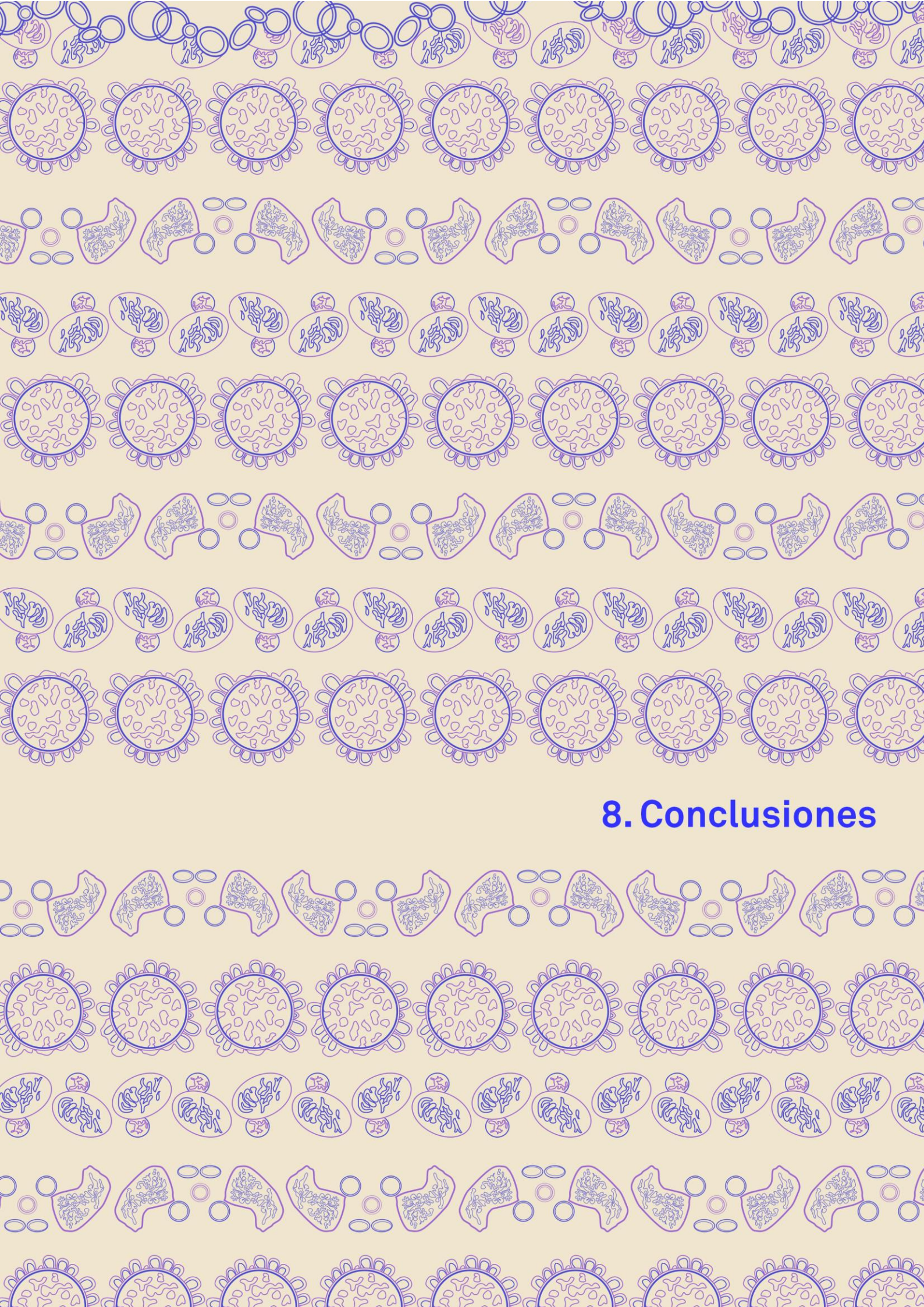
En colaboración con el Dr. Julio García Rodríguez del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Paz (Madrid), se ha desarrollado una base de datos de perfiles proteicos de referencia para la identificación del hongo *H. capsulatum* mediante la tecnología EM MALDI-ToF que permitirá adelantar la identificación, a partir de cultivo, respecto a los métodos convencionales. Los resultados se han concretado en una publicación y la base de datos ha quedado a disposición del Servicio de Microbiología del

Hospital Universitario La Paz, pudiendo compartirse con otros laboratorios respetando los trámites oportunos.

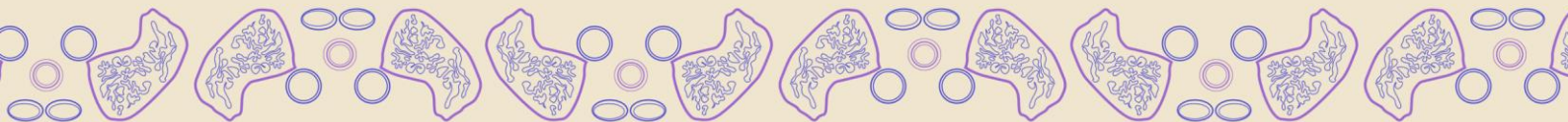
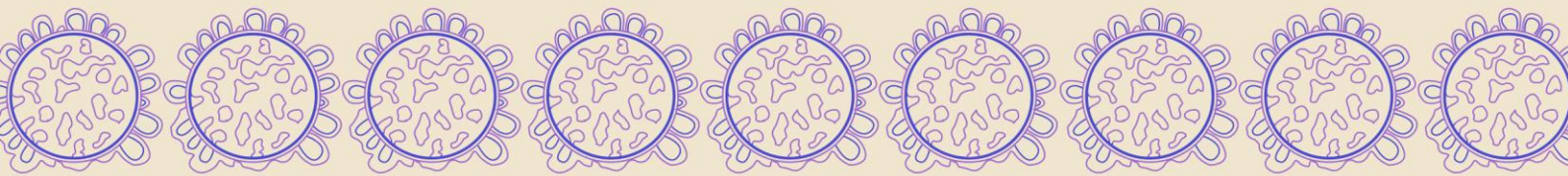
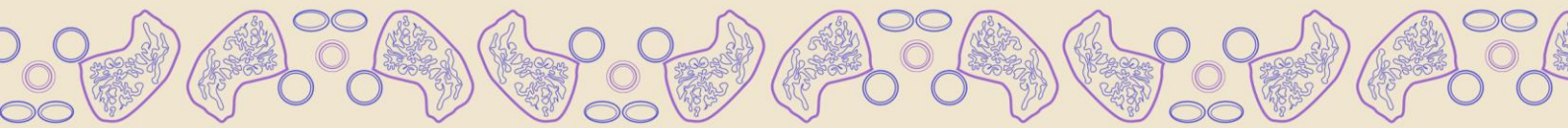
Por último, hemos avanzado en el conocimiento de la histoplasmosis africana. A pesar de las limitaciones debidas al reducido número de pacientes y cepas de origen africano incluidos en el estudio, nuestros resultados sugieren que los conceptos clásicos de la enfermedad deben ser revisados. Además, también se intentarán establecer colaboraciones con los laboratorios de otros países como Francia, Portugal e Italia, que también presentan una importante inmigración procedente del continente africano, con el objetivo de mejorar el reconocimiento de esta micosis, a todas luces, infradiagnosticada.

En el futuro, nuestro objetivo es adaptar todos nuestros métodos a los sistemas sencillos de diagnóstico o *point of care* (POC). Estos métodos son simples, rápidos y robustos, y al mismo tiempo, baratos y sensibles, lo que facilita la implantación de estas técnicas en aquellos lugares en los que las infecciones fúngicas son más prevalentes, como determinadas regiones desfavorecidas de América Latina, África y Asia (Pai NP *et al.*, 2012). Empresas como *Epistem* (Manchester, Reino Unido), con la que el Servicio de Micología ha establecido recientemente una colaboración, han desarrollado dispositivos adaptados a estas condiciones y ya se está trabajando en la transferibilidad de algunas técnicas de qPCR a este tipo de instrumentos, de forma similar a otros estudios ya publicados (Castan P *et al.*, 2014).

En definitiva, los trabajos incluidos en esta tesis doctoral, junto a los desarrollos futuros derivados de ella, permitirán la mejora del diagnóstico precoz y de la identificación de especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas, adelantando el establecimiento de la terapia antifúngica y reduciendo la morbilidad y mortalidad de este tipo de infecciones.



8. Conclusiones



1. La nueva técnica de PCR en tiempo real (qPCR) panfúngica desarrollada es específica, sensible y permite la disminución del tiempo de respuesta. Presenta, por tanto, un gran potencial para la detección precoz de las especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas, así como de las responsables de otro tipo de micosis.

2. La cuantificación de las dianas moleculares mitocondriales del hongo *Pneumocystis jirovecii* revela que el ADN mitocondrial presenta una variabilidad genética inesperada que fluctúa respecto al estado fisiológico del hongo y que permite clasificar los pacientes en base a estas diferencias.

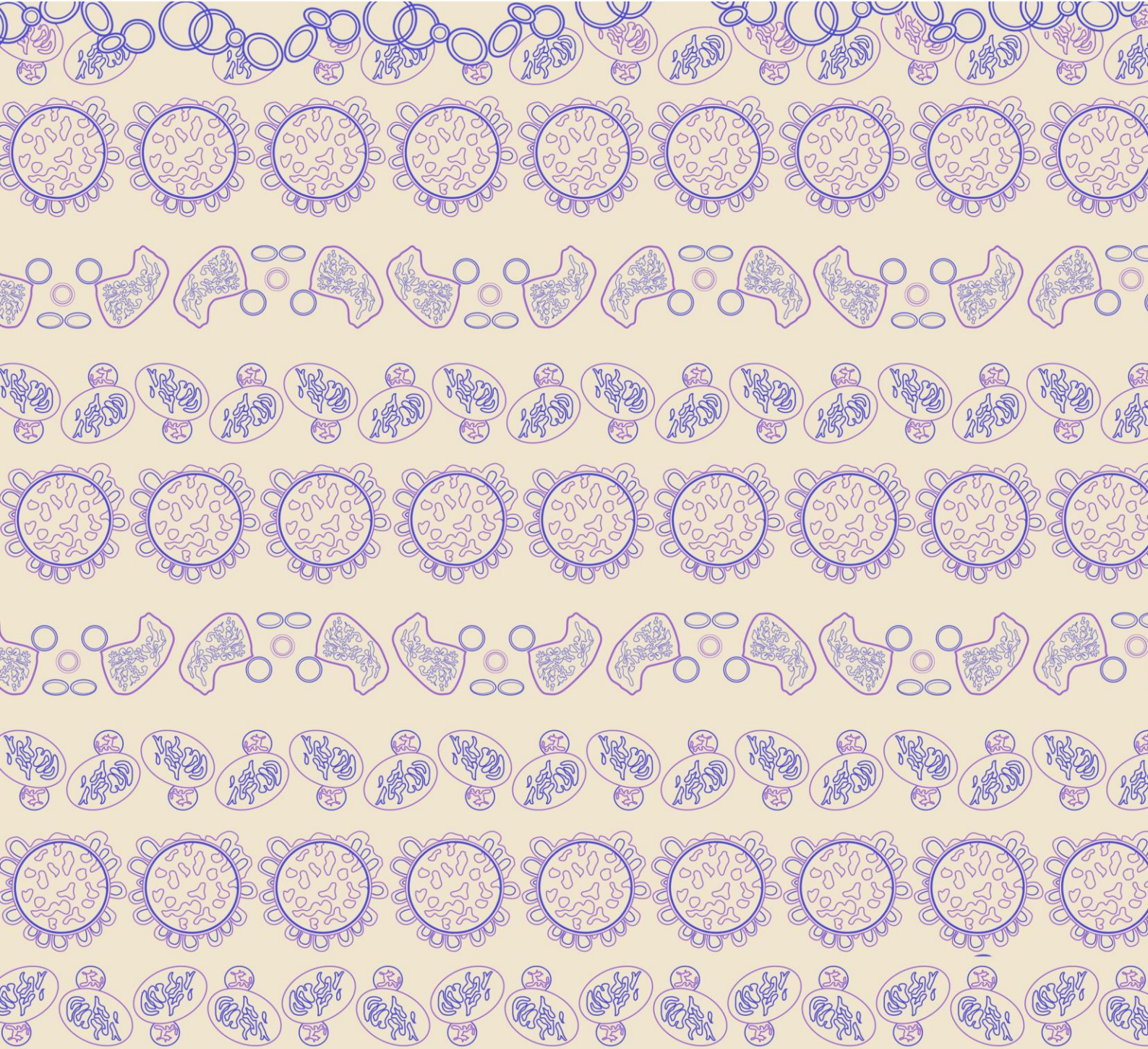
3. La carga fúngica de las muestras respiratorias, determinada mediante PCR en tiempo real, es el criterio más objetivo para la discriminación precisa entre colonización e infección activa en la neumocistosis, siendo el gen que codifica la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial (*mtSSU rRNA*) el mejor candidato para la cuantificación de *Pneumocystis jirovecii* en muestras respiratorias humanas debido a su mayor sensibilidad y estabilidad.

4. La base de datos de referencia de espectros proteicos de *Histoplasma capsulatum* generada es útil para la identificación específica del hongo en fase filamentosa y levaduriforme mediante la espectrometría de masas MALDI-ToF. Este desarrollo permite adelantar la identificación a partir del cultivo, a la vez que reduce el riesgo biológico de la manipulación del hongo.

5. Los conceptos tradicionales sobre la histoplasmosis africana y los métodos clásicos de identificación de las variedades patógenas de *Histoplasma capsulatum* son insuficientes para el correcto reconocimiento de la enfermedad fuera de zona endémica.

6. Los métodos moleculares, basados en el análisis múltiple de secuencias variables (MLSA) y la determinación del tipo sexual, permiten la agrupación de todas las cepas africanas de *Histoplasma capsulatum* indicando su relación genética y sugiriendo que la clasificación tradicional de las variedades debería ser revisada.

7. La aplicación de los resultados de los trabajos incluidos en esta tesis doctoral permitirá la mejora del diagnóstico precoz y de la identificación de las especies fúngicas causantes de neumonías oportunistas, traducándose en un adelanto de la implantación de una terapia antifúngica eficaz que permitirá reducir, a su vez, la morbilidad y mortalidad de este tipo de infecciones.



9. Referencias



Adenis AA, Aznar C y Couppié P. 2014. Histoplasmosis in HIV-infected patients: A review of new developments and remaining gaps. *Curr Trop Med Rep*, 1: 119-128.

Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, et al. 2011a. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect*, 17 (5): 750-5.

Alanio A y Bretagne S. 2017. Performance evaluation of multiplex PCR including *Aspergillus*-not so simple! *Med Mycol*, 55 (1): 56-62.

Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, et al. 2011b. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect*, 17 (10): 1531-7.

Alanio A, Gits-Muselli M, Mercier-Delarue S, Dromer F y Bretagne S. 2016a. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* during infection revealed by ultra-deep pyrosequencing. *Front Microbiol*, 7: 733.

Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, Melchers WJ, Helweg-Larsen J, Matos O, et al. 2016b. ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*, 71 (9): 2386-96.

Alanio A, Vernel-Pauillac F, Sturny-Leclère A y Dromer F. 2015. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. *MBio*, 6 (2).

Alastruey-Izquierdo A, Castelli MV, Cuesta I, Zaragoza Ó, Monzón A, Mellado E, et al. 2009. In vitro activity of antifungals against Zygomycetes. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 5: 71-6.

Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Álvarez M, et al. 2009. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother*, 57 (7):3380-7.

Albataineh MT, Sutton DA, Fothergill AW y Wiederhold NP. 2016. Update from the laboratory: clinical identification and susceptibility testing of fungi and trends in antifungal resistance. *Infect Dis Clin North Am*, 30 (1): 13-35.

Alonso M, Escribano P, Guinea J, Recio S, Simon A, Peláez T, et al. 2012. Rapid detection and identification of *Aspergillus* from lower respiratory tract specimens by use of a combined probe-high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol*, 50 (10): 3238-43.

Ambasta A, Carson J y Church DL. 2015. The use of biomarkers and molecular methods for the earlier diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Med Mycol*, 53 (6): 531-57.

Antinori S. 2013. New insights into HIV/AIDS-associated cryptococcosis. *ISRN AIDS*, 2013 471363.

Antinori S, Magni C, Nebuloni M, Parravicini C, Corbellino M, Sollima S, et al. 2006. Histoplasmosis among human immunodeficiency virus-infected people in Europe: report of 4 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 85 (1): 22-36.

Área de Vigilancia de VIH y Comportamientos de Riesgo. 2016. Vigilancia epidemiológica del VIH y SIDA en España: Sistema de información sobre nuevos diagnósticos de VIH (SINIVIH) y Registro Nacional de casos de SIDA [Online]. *Vigilancia epidemiológica*. S.G. de Promoción de la Salud y Epidemiología/Centro Nacional de Epidemiología-ISCIII. Disponible en: https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIH_SIDA_2016.pdf [Accedido en: Diciembre, 2016].

Armstrong-James D, Meintjes G y Brown GD. 2014. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol*, 22 (3): 120-7.

Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM y Mylonakis E. 2014. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, 27 (3): 490-526.

Ayats J, Martin-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. 2011. [Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29 (1): 39. e1-15.

Babouee Flury B, Goldenberger D, Elzi L, Lardinois D, Sadowski-Cron C, Bubendorf L, et al. 2013. Prospective study of a panfungal PCR assay followed by sequencing, for the detection of fungal DNA in normally sterile specimens in a clinical setting: a complementary tool in the diagnosis of invasive fungal disease? *Clin Microbiol Infect*, 19 (8): E354-7.

Babouee Flury B, Weisser M, Prince SS, Bubendorf L, Battegay M, Frei R, et al. 2014. Performances of two different panfungal PCRs to detect mould DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue: what are the limiting factors? *BMC Infect Dis*, 14: 692.

Baddley JW y Dismukes WE. 2011. Cryptococcosis. En: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD y Dismukes WE (eds.), *Essentials of Clinical Mycology*. Second Edition. Ed: Springer-Verlag New York.

Baddley JW, Sankara IR, Rodriguez JM, Pappas PG y Many WJ, Jr. 2008. Histoplasmosis in HIV-infected patients in a southern regional medical center: poor prognosis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 62 (2): 151-6.

Bader O. 2013. MALDI-ToF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 13 (5): 788-99.

Bader O. 2017. Fungal species identification by MALDI-ToF mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 1508: 323-337.

Badiee P y Hashemizadeh Z. 2014. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res*, 139 (2): 195-204.

Bahr NC, Antinori S, Wheat LJ y Sarosi GA. 2015. Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River valley. *Curr Trop Med Rep*, 2 (2): 70-80.

Becker PT, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. 2014. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-ToF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol*, 52 (8): 826-34.

Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P y Kauserud H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol*, 10: 189.

Bernal-Martínez L, Alastruey-Izquierdo A y Cuenca-Estrella M. 2016. Diagnostics and susceptibility testing in *Aspergillus*. *Future Microbiol*, 11 (2): 315-28.

Bernal-Martínez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Rodríguez-Tudela JL y 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 (1): E1-7.

Bezdicek M, Lengerova M, Ricna D, Weinbergerova B, Kocmanova I, Volfova P, et al. 2016. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Med Mycol*, 54 (7): 714-24.

Blumer S y Kaufman L. 1968. Variation in enzymatic activities among strains of *Histoplasma capsulatum* and *Histoplasma duboisii*. *Sabouraudia*, 6 (3): 203-6.

Brandt ME, Lockhart SR y Warnock DW. 2011. Laboratory aspects of medical mycology. En: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD y Dismukes WE (eds.), *Essentials of Clinical Mycology*. Second Edition. Ed: Springer-Verlag New York.

Brizendine KD, Baddley JW y Pappas PG. 2011. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*, 32 (6): 727-34.

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG y White TC. 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 4 (165): 165rv13.

Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, Al-Mohsen I, Almodavar E, Gutiérrez MI, et al. 2005. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J Med Microbiol*, 54 (Pt 3): 243-8.

Buchan BW y Ledebouer NA. 2014. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*, 27 (4): 783-822.

Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, Bernal-Martínez L, Prieto M, García-Reyne A, et al. 2013a. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin Microbiol Infect*, 19 (6): E271-7.

Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL y 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 (10): 665-8.

Buitrago MJ, Bernal-Martínez L, Castelli MV, Rodríguez-Tudela JL y Cuenca-Estrella M. 2014. Performance of panfungal- and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: a 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. *J Clin Microbiol*, 52 (5): 1737-40.

Buitrago MJ, Canteros CE, Frías De León G, González A, Marques-Evangelista De Oliveira M, Muñoz CO, et al. 2013b. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev Iberoam Micol*, 30 (4): 256-60.

Buitrago MJ y Cuenca-Estrella M. 2012. [Current epidemiology and laboratory diagnosis of endemic mycoses in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 30 (7): 407-13.

Cadena J, Thompson GR, 3rd y Patterson TF. 2016. Invasive aspergillosis: current strategies for diagnosis and management. *Infect Dis Clin North Am*, 30 (1): 125-42.

Cantón R y García-Rodríguez J. 2016. La espectrometría de masas MALDI-ToF en microbiología clínica. De la innovación a la rutina del laboratorio. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 34 Suppl 2 1-2.

Carmona EM y Limper AH. 2011. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. *Ther Adv Respir Dis*, 5 (1): 41-59.

Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. 2011. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*, 6 (12): e28425.

Castan P, de Pablo A, Fernández-Romero N, Rubio JM, Cobb BD, Mingorance J, et al. 2014. Point-of-care system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance in sputum samples. *J Clin Microbiol*, 52 (2): 502-7.

CDC. 2016a. Histoplasmosis statistics. Public health surveillance for histoplasmosis [Online]. *Fungal diseases. Types of fungal diseases. Histoplasmosis*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponible en: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/histoplasmosis/statistics.html> [Accedido en: Diciembre, 2016].

CDC. 2016b. Valley fever (coccidioidomycosis) statistics. Public health surveillance for valley fever [Online]. *Fungal diseases. Types of fungal diseases. Coccidioidomycosis*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponible en: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/coccidioidomycosis/statistics.html> [Accedido en: Diciembre, 2016].

Cerqueira GC, Arnaud MB, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley G, Simison M, et al. 2014. The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res*, 42 (Database issue): D705-10.

Chandra H, Chandra S y Sharma A. 2012. Histoplasmosis on bone marrow aspirate cytological examination associated with hemophagocytosis and pancytopenia in an AIDS patient. *Korean J Hematol*, 47 (1): 77-9.

Chang CC, Sorrell TC y Chen SC. 2015. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*, 36 (5): 681-91.

Chen SC, Blyth CC, Sorrell TC y Slavin MA. 2011. Pneumonia and lung infections due to emerging and unusual fungal pathogens. *Semin Respir Crit Care Med*, 32 (6): 703-16.

Cissé OH, Pagni M y Hauser PM. 2012. De novo assembly of the *Pneumocystis jirovecii* genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. *MBio*, 4 (1): e00428-12.

Colombo AL, Tobon A, Restrepo A, Queiroz-Telles F y Nucci M. 2011. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*, 49 (8): 785-98.

Cordonnier C, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, et al. 2016. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*, 71 (9): 2379-85.

Coremans J. 1963. [A biochemical test for the differentiation of *Histoplasma duboisii* Vanbreuseghem 1952 from *Histoplasma capsulatum* Darling 1906]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 157: 1130-2.

Coulibaly O, Marinach-Patrice C, Cassagne C, Piarroux R, Mazier D y Ranque S. 2011. *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Med Mycol*, 49 (6): 621-6.

Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Rácil Z, Richardson M y Rogers TR. 2011. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother*, 66 Suppl 1 i15-24.

de Armas Rodríguez Y, Wissmann G, Müller AL, Pederiva MA, Brum MC, Brackmann RL, et al. 2011. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in developing countries. *Parasite*, 18 (3): 219-28.

de Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, et al. 2012. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*, 18 (5): 475-84.

De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. 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 (12): 1813-21.

Diaz MR, Boekhout T, Kiesling T y Fell JW. 2005. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*, 5 (12): 1129-40.

Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ y Sogin ML. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334 (6182): 519-522.

Edwards JA, Chen C, Kemski MM, Hu J, Mitchell TK y Rappleye CA. 2013. *Histoplasma* yeast and mycelial transcriptomes reveal pathogenic-phase and lineage-specific gene expression profiles. *BMC Genomics*, 14: 695.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 19 (1): 165-256.

Falci DR, Hoffmann ER, Paskulin DD y Pasqualotto AC. 2016. Progressive disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of non-culture-based diagnostic tests. *Braz J Infect Dis*, 21 (1): 7-11.

Fan LC, Lu HW, Cheng KB, Li HP y Xu JF. 2013. Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review. *PLoS One*, 8 (9): e73099.

Farmakiotis D y Kontoyiannis DP. 2016. Mucormycoses. *Infect Dis Clin North Am*, 30 (1): 143-63.

Fillaux J, Malvy S, Álvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, et al. 2008. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Microbiol Methods*, 75 (2): 258-61.

Fortún J, Meije Y, Fresco G y Moreno S. 2012. [Aspergillosis. Clinical forms and treatment]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 30 (4): 201-8.

Gago S, Buitrago MJ, Clemons KV, Cuenca-Estrella M, Mirels LF y Stevens DA. 2014a. Development and validation of a quantitative real-time PCR assay for the early diagnosis of coccidioidomycosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 79 (2): 214-21.

Gago S, Esteban C, Valero C, Zaragoza Ó, Puig de la Bellacasa J y Buitrago MJ. 2014b. 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. *J Clin Microbiol*, 52 (4): 1168-76.

Gago S, Zaragoza Ó, Cuesta I, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M y Buitrago MJ. 2011. High-resolution melting analysis for identification of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* complex. *J Clin Microbiol*, 49 (10): 3663-6.

Gautier M, Ranque S, Normand AC, Becker P, Packeu A, Cassagne C, et al. 2014. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect*, 20 (12): 1366-71.

GBD HIV Collaborators. 2016. Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980-2015: the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet HIV*, 3 (8): e361-87.

Gingo MR, Balasubramani GK, Kingsley L, Rinaldo CRJ, Alden CB, Detels R, et al. 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.

Glaeser SP y Kampfer P. 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol*, 38 (4): 237-45.

Gómez BL. 2014. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: advances and challenges. *Rev Iberoam Micol*, 31 (1): 35-41.

Gregg KS y Kauffman CA. 2015. Invasive aspergillosis: epidemiology, clinical aspects, and treatment. *Semin Respir Crit Care Med*, 36 (5): 662-72.

Guarro J. 2013. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32 (12): 1491-500.

Gugnani HC. 2000. Histoplasmosis in Africa: a review. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 42 (4): 271-7.

Gugnani HC y Muotoe-Okafor F. 1997. African histoplasmosis: a review. *Rev Iberoam Micol*, 14 (4): 155-9.

Hage CA, Azar MM, Bahr N, Loyd J y Wheat LJ. 2015. Histoplasmosis: up-to-date evidence-based approach to diagnosis and management. *Semin Respir Crit Care Med*, 36 (5): 729-45.

Hage CA, Knox KS, Davis TE y Wheat LJ. 2011. Antigen detection in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of fungal pneumonia. *Curr Opin Pulm Med*, 17 (3): 167-71.

Hage CA, Knox KS y Wheat LJ. 2012. Endemic mycoses: overlooked causes of community acquired pneumonia. *Respir Med*, 106 (6): 769-76.

Halliday CL, Kidd SE, Sorrell TC y Chen SC. 2015. Molecular diagnostic methods for invasive fungal disease: the horizon draws nearer? *Pathology*, 47 (3): 257-69.

Hrncirova K, Lengerova M, Kocmanova I, Racil Z, Volfova P, Palousova D, et al. 2010. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol*, 48 (9): 3392-4.

Hsu JL, Ruoss SJ, Bower ND, Lin M, Holodniy M y Stevens DA. 2011. Diagnosing invasive fungal disease in critically ill patients. *Crit Rev Microbiol*, 37 (4): 277-312.

Huber F, Nacher M, Aznar C, Pierre-Demar M, El Guedj M, Vaz T, et al. 2008. AIDS-related *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* infection: 25 years experience of French Guiana. *AIDS*, 22 (9): 1047-53.

Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M, Vu D, et al. 2015. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol*, 53 (4): 313-37.

Jerez-Puebla LE. 2012. Fungal infections in immunosuppressed patients. Immunodeficiency [Online]. *InTech*. Prof. Krassimir Metodiev (ed.). Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/immunodeficiency/fungal-infections-in-immunosuppressed-patients> [Accedido en Enero, 2017].

José RJ y Brown JS. 2012. Opportunistic and fungal infections of the lung. *Medicine*, 40 (6): 335-339.

Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, Brooks JT, Pau A, Masur H, et al. 2009. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*, 58 (RR-4): 1-207; quiz CE1-4.

Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA y Falagas ME. 2013. Accuracy of beta-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*, 19 (1): 39-49.

Kashif M, Tariq H, Ijaz M y Gómez-Márquez J. 2015. Disseminated histoplasmosis and secondary hemophagocytic syndrome in a non-HIV patient. *Case Rep Crit Care*, 2015 295735.

Kassis C, Zaidi S, Kuberski T, Moran A, Gonzalez O, Hussain S, et al. 2015. Role of *Coccidioides* antigen testing in the cerebrospinal fluid for the diagnosis of coccidioidal meningitis. *Clin Infect Dis*, 61 (10): 1521-6.

Kasuga T, Taylor JW y White TJ. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol*, 37 (3): 653-63.

Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, et al. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol*, 12 (12): 3383-401.

Kauffman CA. 2007. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev*, 20 (1): 115-32.

Kauffman CA. 2011. Histoplasmosis. En: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD y Dismukes WE (eds.), *Essentials of Clinical Mycology*. Second Edition. Ed: Springer-Verlag New York.

- Kenyon C, Bonorchis K, Corcoran C, Meintjes G, Locketz M, Lehloenya R, et al.** 2013. A dimorphic fungus causing disseminated infection in South Africa. *N Engl J Med*, 369 (15): 1416-24.
- Khot PD y Fredricks DN.** 2009. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7 (10): 1201-21.
- Knox KS y Hage CA.** 2010. Histoplasmosis. *Proc Am Thorac Soc*, 7 (3): 169-72.
- Kosmidis C y Denning DW.** 2015. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*, 70 (3): 270-7.
- Kozel TR y Wickes B.** 2014. Fungal diagnostics. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4 (4): a019299.
- Kralovic SM y Rhodes JC.** 1998. Utility of routine testing of bronchoalveolar lavage fluid for cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol*, 36 (10): 3088-9.
- Lackner M, Hagen F, Meis JF, Gerrits van den Ende AH, Vu D, Robert V, et al.** 2014. Susceptibility and diversity in the therapy-refractory genus *Scedosporium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 58 (10): 5877-85.
- Lamoth F y Alexander BD.** 2014. Nonmolecular methods for the diagnosis of respiratory fungal infections. *Clin Lab Med*, 34 (2): 315-36.
- Lass-Flörl C y Mayr A.** 2009. Diagnosing invasive fungal diseases-limitations of microbiological diagnostic methods. *Expert Opin Med Diagn*, 3 (4): 461-70.
- Lass-Flörl C, Mutschlechner W, Aigner M, Grif K, Marth C, Girschikofsky M, et al.** 2013. Utility of PCR in diagnosis of invasive fungal infections: real-life data from a multicenter study. *J Clin Microbiol*, 51 (3): 863-8.

Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, et al. 2007. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol*, 45 (2): 380-5.

Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM y Zelazny AM. 2013. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 51 (3): 828-34.

Lau SK, Lam CS, Ngan AH, Chow WN, Wu AK, Tsang DN, et al. 2016. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of mold and yeast cultures of *Penicillium marneffeii*. *BMC Microbiol*, 16: 36.

Le Gal S, Robert-Gangneux F, Pepino Y, Belaz S, Damiani C, Gueguen P, et al. 2017. A misleading false-negative result of *Pneumocystis* real-time PCR assay due to a rare punctual mutation: a French multicenter study. *Med Mycol*, 55 (2): 180-184.

Lease ED y Alexander BD. 2011. Fungal diagnostics in pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med*, 32 (6): 663-72.

Letourneau AR, Issa NC y Baden LR. 2014. Pneumonia in the immunocompromised host. *Curr Opin Pulm Med*, 20 (3): 272-9.

Limper AH. 2010. The changing spectrum of fungal infections in pulmonary and critical care practice: clinical approach to diagnosis. *Proc Am Thorac Soc*, 7 (3): 163-8.

Louis M, Guitard J, Jodar M, Ancelle T, Magne D, Lascols O, et al. 2015. Impact of HIV infection status on interpretation of quantitative PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol*, 53 (12): 3870-5.

Loulergue P, Bastides F, Baudouin V, Chandenier J, Mariani-Kurkdjian P, Dupont B, et al. 2007. Literature review and case histories of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* infections in HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis*, 13 (11): 1647-52.

Lowe DM, Rangaka MX, Gordon F, James CD y Miller RF. 2013. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in tropical and low and middle income countries: a systematic review and meta-regression. *PLoS One*, 8 (8): e69969.

Lu Y, Chen YQ, Guo YL, Qin SM, Wu C y Wang K. 2011a. Diagnosis of invasive fungal disease using serum (1→3)-β-D-glucan: a bivariate meta-analysis. *Intern Med*, 50 (22): 2783-91.

Lu Y, Ling G, Qiang C, Ming Q, Wu C, Wang K, et al. 2011b. PCR diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: a bivariate meta-analysis. *J Clin Microbiol*, 49 (12): 4361-3.

Ma L, Chen Z, Huang da W, Kutty G, Ishihara M, Wang H, et al. 2016. Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. *Nat Commun*, 7 10740.

Ma L, Huang DW, Cuomo CA, Sykes S, Fantoni G, Das B, et al. 2013. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis*. *FASEB J*, 27 (5): 1962-72.

Maillet M, Maubon D, Brion JP, Francois P, Molina L, Stahl JP, et al. 2014. *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33 (3): 331-6.

Malcolm TR y Chin-Hong PV. 2013. Endemic mycoses in immunocompromised hosts. *Curr Infect Dis Rep*, 15 (6): 536-43.

Martin-Iguacel R, Kurtzhals J, Jouvion G, Nielsen SD y Llibre JM. 2014. Progressive disseminated histoplasmosis in the HIV population in Europe in the HAART era. Case report and literature review. *Infection*, 42 (4): 611-20.

Masannat FY y Ampel NM. 2010. Coccidioidomycosis in patients with HIV-1 infection in the era of potent antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, 50 (1): 1-7.

Mathews DM, John R, Verghese V, Parmar H, Chaudhary N, Mishra S, et al. 2016. *Histoplasma capsulatum* infection with extensive lytic bone lesions mimicking LCH. *J Trop Pediatr*, 62 (6): 496-499.

Maziarz EK y Perfect JR. 2016. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, 30 (1): 179-206.

Mazuelos EM y Garcia AI. 2010. [Microbiological aspects of the cryptococcosis in the post-HAART era]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28 Suppl 1: 40-5.

McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW y Vilgalys R. 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends Microbiol*, 17 (11): 488-97.

Mikulska M, Furfaro E y Viscoli C. 2015. Non-cultural methods for the diagnosis of invasive fungal disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 13 (1): 103-17.

Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, et al. 2013. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, 56 (10): e95-101.

Montesinos I, Brancart F, Schepers K, Jacobs F, Denis O y Delforge ML. 2015. Comparison of 2 real-time PCR assays for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in human immunodeficiency virus (HIV) and non-HIV immunocompromised patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 82 (2): 143-7.

Morris A y Norris KA. 2012. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev*, 25 (2): 297-317.

Morris A, Wei K, Afshar K y Huang L. 2008. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *J Infect Dis*, 197 (1): 10-7.

Moser SA y Wicker J. 2016. Commercial methods for identification and susceptibility testing of fungi. En: Truant AL (ed.), *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology* Second Edition. Ed: John Wiley & Sons, Inc.

Mulanovich VE y Kontoyiannis DP. 2011. Fungal pneumonia in patients with hematologic malignancies: current approach and management. *Curr Opin Infect Dis*, 24 (4): 323-32.

Muniz MM, Sousa CN, Evangelista Oliveira MM, Pizzini CV, Almeida MA, Rodríguez-Arellanes G, et al. 2014. Sexual variability in *Histoplasma capsulatum* and its possible distribution: what is going on? *Rev Iberoam Micol*, 31 (1): 7-10.

Muñoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME, et al. 2010. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. *J Clin Microbiol*, 48 (6): 2147-53.

Murata M, Furusyo N, Otaguro S, Nabeshima S, Ariyama I y Hayashi J. 2007. HIV infection with concomitant cerebral toxoplasmosis and disseminated histoplasmosis in a 45-year-old man. *J Infect Chemother*, 13 (1): 51-5.

Nacher M, Adenis A, Mc Donald S, Do Socorro Mendonca Gomes M, Singh S, Lopes Lima I, et al. 2013. Disseminated histoplasmosis in HIV-infected patients in South America: a neglected killer continues on its rampage. *PloS Negl Trop Dis*, 7 (11): e2319.

Nahimana A, Francioli P, Blanc DS, Bille J, Wakefield AE y Hauser PM. 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 (4): 368-72.

Nalintya E, Kiggundu R y Meya D. 2016. Evolution of cryptococcal antigen testing: what is new? *Curr Fungal Infect Rep*, 2016: 1-6.

Neglected Histoplasmosis in Latin America Group. 2016. Disseminated histoplasmosis in Central and South America, the invisible elephant: the lethal blind spot of international health organizations. *AIDS*, 30 (2): 167-70.

Nobrega de Almeida J, Jr, del Negro GM, Grenfell RC, Vidal MS, Thomaz DY, de Figueiredo DS, et al. 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for differentiation of the dimorphic fungal species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *J Clin Microbiol*, 53 (4): 1383-6.

Normand AC, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, et al. 2017. Decision criteria for MALDI-ToF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol*, 17 (1): 25.

Normand AC, Cassagne C, Ranque S, L'Ollivier C, Fourquet P, Roesems S, et al. 2013. Assessment of various parameters to improve MALDI-ToF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol*, 13: 76.

Odell ID, Cloud JL, Seipp M y Wittwer CT. 2005. Rapid species identification within the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group by high-resolution melting analysis of hsp65 PCR products. *Am J Clin Pathol*, 123 (1): 96-101.

Ostrosky-Zeichner L. 2012. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*, 125 (1 Suppl): S14-24.

Pai NP, Vадnais C, Denkinger C, Engel N y Pai M. 2012. Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLoS Med*, 9 (9): e1001306.

Park B, Park J, Cheong KC, Choi J, Jung K, Kim D, et al. 2011. Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. *Nucleic Acids Res*, 39 (Database issue): D640-6.

Park BJ, Pappas PG, Wannemuehler KA, Alexander BD, Anaissie EJ, Andes DR, et al. 2011. Invasive non-*Aspergillus* mold infections in transplant recipients, United States, 2001-2006. *Emerg Infect Dis*, 17 (10): 1855-64.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG y Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23 (4): 525-30.

Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, et al. 2000. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. *Medicine (Baltimore)*, 79 (4): 250-60.

Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E y Crandall KA. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*, 16: 38-53.

Perfect JR. 2013. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr Med Res Opin*, 29 Suppl 4: 3-11.

Petrikkos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ y Kontoyiannis DP. 2012. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 1: S23-34.

Petti CA, Bosshard PP, Brandt ME, Clarridge JE, Feldblyum TV, Foxall P, et al. 2008. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9): e45.

Pfeiffer CD, Fine JP y Safdar N. 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 42 (10): 1417-27.

Plan Nacional sobre el SIDA. 2016. Nuevos diagnósticos de infección por VIH (Infografía) [Online]. *Enfermedades transmisibles: VIH y SIDA*: S.G. de Promoción de la Salud y Epidemiología/Centro Nacional de Epidemiología-ISCIII. Disponible en:

<http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/InfografiaV124nov2016.pdf> [Accedido en: Febrero, 2017].

Posteraro B, De Carolis E, Vella A y Sanguinetti M. 2013. MALDI-ToF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics*, 10 (2): 151-64.

Powers-Fletcher MV y Hanson KE. 2016. Nonculture diagnostics in fungal disease. *Infect Dis Clin North Am*, 30 (1): 37-49.

Prattes J, Heldt S, Eigl S y Hoenigl M. 2016. Point of care testing for the diagnosis of fungal infections: are we there yet? *Curr Fungal Infect Rep*, 10: 43-50.

Quiles-Melero I, Peláez T, Rezusta-López A y García-Rodríguez J. 2016. [Application of mass spectrometry in mycology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 34 Suppl 2: 26-30.

Randell P. 2014. It's a MALDI but it's a goodie: MALDI-ToF mass spectrometry for microbial identification. *Thorax*, 69 (8): 776-8.

Reed GH, Kent JO y Wittwer CT. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8 (6): 597-608.

Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, et al. 2004. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect*, 10 (11): 1029-31.

Restrepo MI, Faverio P y Anzueto A. 2013. Long-term prognosis in community-acquired pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*, 26 (2): 151-158.

Rey A, Losada C, Santillán J, Fiorentini F, Schiaffino M, Peroni HJ, et al. 2015. [*Pneumocystis jirovecii* infection in patients with and without HIV: A comparison]. *Rev Chilena Infectol*, 32 (2): 175-80.

- Rizzato C, Lombardi L, Zoppo M, Lupetti A y Tavanti A.** 2015. Pushing the limits of MALDI-ToF mass spectrometry: beyond fungal species identification. *J Fungi*, 1 (3): 367-383.
- Robberts FJ, Liebowitz LD y Chalkley LJ.** 2007. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58 (4): 385-92.
- Rodríguez-Arellanes G, Nascimento de Sousa C, de Medeiros-Muniz M, Ramírez JA, Pizzini CV, de Abreu-Almeida M, et al.** 2013. Frequency and genetic diversity of the *MAT1* locus of *Histoplasma capsulatum* isolates in Mexico and Brazil. *Eukaryot Cell*, 12(7):1033-8.
- Rodríguez-Tudela JL, Alastruey-Izquierdo A, Gago S, Cuenca-Estrella M, León C, Miro JM, et al.** 2015. Burden of serious fungal infections in Spain. *Clin Microbiol Infect*, 21 (2):183-9.
- Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-Robert F, Hamane S, Lafabrie A, et al.** 2014. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with or without AIDS, France. *Emerg Infect Dis*, 20 (9): 1490-7.
- Sanguinetti M y Posteraro B.** 2017. Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 55 (2): 369-379.
- Schneider E, Whitmore S, Glynn KM, Dominguez K, Mitsch A, McKenna MT, et al.** 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.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al.** 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (16): 6241-6.
- Schrödl W, Heydel T, Schwartze VU, Hoffmann K, Grosse-Herrenthey A, Walther G, et al.** 2012. Direct analysis and identification of pathogenic *Lichtheimia* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analyzer-mediated mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 50 (2): 419-27.

Sharmin S, Ohori A, Sano A, Kamei K, Yamaguchi M, Takeo K, et al. 2003. *Histoplasma capsulatum* variety *duboisii* isolated in Japan from an HIV-infected Ugandan patient. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 44 (4): 299-306.

Shi XY, Liu Y, Gu XM, Hao SY, Wang YH, Yan D, et al. 2016. Diagnostic value of (1 → 3)-beta-D-glucan in bronchoalveolar lavage fluid for invasive fungal disease: A meta-analysis. *Respir Med*, 117: 48-53.

Sidiq F, Hoostal M y Rogers SO. 2016. Rapid identification of fungi in culture-negative clinical blood and respiratory samples by DNA sequence analyses. *BMC Res Notes*, 9: 293.

Siegel M, Masur H y Kovacs J. 2016. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in human immunodeficiency virus infection. *Semin Respir Crit Care Med*, 37 (2): 243-56.

Simon S, Veron V, Boukhari R, Blanchet D y Aznar C. 2010. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66 (3): 268-73.

Sitterlé E, Giraud S, Leto J, Bouchara JP, Rougeron A, Morio F, et al. 2014. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. *Clin Microbiol Infect*, 20 (9): 929-35.

Skalski JH, Kottom TJ y Limper AH. 2015. Pathobiology of *Pneumocystis* pneumonia: life cycle, cell wall and cell signal transduction. *FEMS Yeast Res*, 15 (6).

Sleiman S, Halliday CL, Chapman B, Brown M, Nitschke J, Lau AF, et al. 2016. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Aspergillus*, *Scedosporium*, and *Fusarium* spp. in the Australian clinical setting. *J Clin Microbiol*, 54 (8): 2182-6.

Smith JA y Kauffman CA. 2012. Pulmonary fungal infections. *Respirology*, 17 (6): 913-26.

Somogyvari F, Horvath A, Serly J, Majoros H, Vagvolgyi C y Peto Z. 2012. Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. *In Vivo*, 26 (6): 979-83.

Sugawara Y, Nakase K, Nakamura A, Ohishi K, Sugimoto Y, Fujieda A, et al. 2013. Clinical utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders. *Eur J Haematol*, 90 (4): 331-9.

Summah H, Zhu YG, Falagas ME, Vouloumanou EK y 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 (Engl)*, 126 (10): 1965-73.

Tamburrini E, Mencarini P, Visconti E, De Luca A, Zolfo M, Siracusano A, et al. 1996a. Imbalance between *Pneumocystis carinii* cysts and trophozoites in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pneumocystosis receiving prophylaxis. *J Med Microbiol*, 45 (2): 146-8.

Tamburrini E, Mencarini P, Visconti E, Zolfo M, De Luca A, Siracusano A, et al. 1996b. Comparison of two PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid. *J Eukaryot Microbiol*, 43 (5): 20S.

Tasaka S y Tokuda H. 2013. Recent advances in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected adults. *Expert Opin Med Diagn*, 7 (1): 85-97.

Tasaka S y Tokuda H. 2014. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *Kansenshogaku Zasshi*, 88 (6 Suppl 11): 26-39.

Teixeira M de M, Patane JS, Taylor ML, Gómez BL, Theodoro RC, de Hoog S, et al. 2016. Worldwide phylogenetic distributions and population dynamics of the genus *Histoplasma*. *PLoS Negl Trop Dis*, 10 (6): e0004732.

Thompson GR, 3rd y Patterson TF. 2011. Pulmonary aspergillosis: recent advances. *Semin Respir Crit Care Med*, 32 (6): 673-81.

Trubiano JA, Dennison AM, Morrissey CO, Chua KY, Halliday CL, Chen SC, et al. 2016. Clinical utility of panfungal polymerase chain reaction for the diagnosis of invasive fungal disease: a single center experience. *Med Mycol*, 54 (2): 138-46.

Tsiodras S, Drogari-Apiranthitou M, Pilichos K, Leventakos K, Kelesidis T, Buitrago MJ, et al. 2012. An unusual cutaneous tumor: African histoplasmosis following mudbaths: case report and review. *Am J Trop Med Hyg*, 86 (2): 261-3.

UNAIDS. 2014. The Gap Report [Online]. *Resources:* UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Disponible en: http://files.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2014/UNAIDS_Gap_report_en.pdf [Accedido en: Diciembre, 2016].

UNAIDS. 2016. Prevention Gap Report [Online]. *Resources:* UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2016-prevention-gap-report_en.pdf [Accedido en: Diciembre, 2016].

Unda F, Agüero J, Farinas MC y Martínez-Martínez L. 2011. [Identification of clinically relevant fungi using molecular techniques]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29 (4): 282-5.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7): RESEARCH0034.

Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, et al. 2001. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis*, 32 (6): 855-61.

Vento S, Cainelli F y Temesgen Z. 2008. Lung infections after cancer chemotherapy. *Lancet Oncol*, 9 (10): 982-92.

Veron V, Simon S, Blanchet D y Aznar C. 2009. Real-time polymerase chain reaction detection of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in human samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 65 (1): 69-72.

Vila Estapé J, Zboromyrska Y, Vergara Gómez A, Alejo Cancho I, Rubio García E, Álvarez-Martínez MJ, et al. 2016. [Molecular diagnostic methods of respiratory infections. Has the scheme diagnosis changed?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 34 Suppl 3: 40-6.

Vite-Garín T, Estrada-Bárceñas DA, Cifuentes J y Taylor ML. 2014. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. *Rev Iberoam Micol*, 31 (1): 11-5.

Vollmer T, Stormer M, Kleesiek K y Dreier J. 2008. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 46 (6): 1919-26.

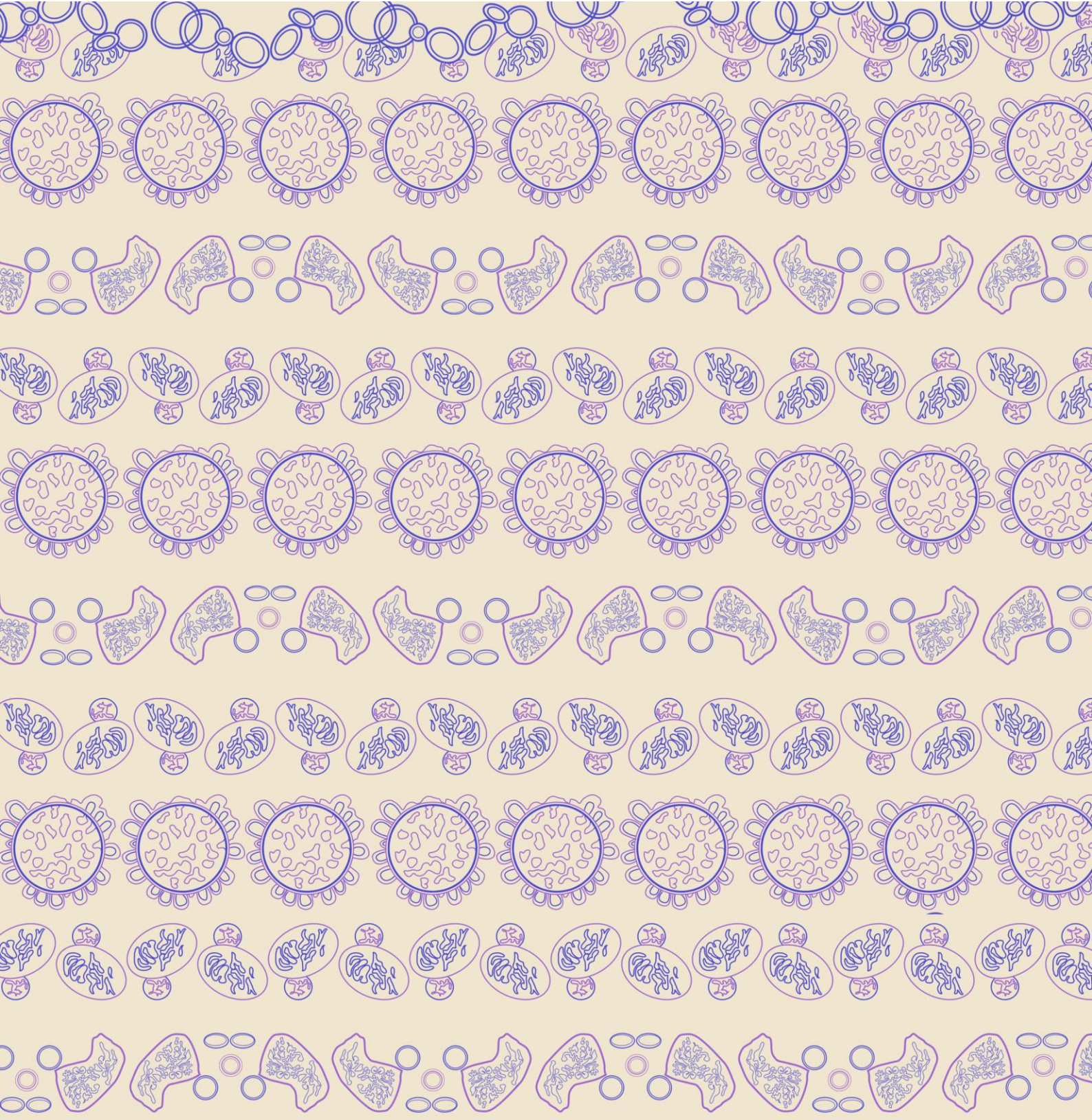
Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF y Hage C. 2016. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*, 30 (1): 207-27.

White PL, Wingard JR, Bretagne S, Loffler J, Patterson TF, Slavin MA, et al. 2015. *Aspergillus* polymerase chain reaction: systematic review of evidence for clinical use in comparison with antigen testing. *Clin Infect Dis*, 61 (8): 1293-303.

WHO. 2016. Neumonía, nota descriptiva [Online]. *Centro de Prensa*. WHO. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/> [Accedido en: Diciembre, 2016].

Yiannakis EP y Boswell TC. 2016. Systematic review of outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: evidence that *P. jirovecii* is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. *J Hosp Infect*, 93 (1): 1-8.

Zida A, Niamba P, Barro-Traore F, Korsaga-Some N, Tapsoba P, Briegel J, et al. 2015. Disseminated histoplasmosis caused by *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* in a non-HIV patient in Burkina Faso: Case report. *J Mycol Med*, 25 (2): 159-62.



10. Anexos



ANEXO I: LISTADO CEBADORES Y SONDAS EMPLEADOS

Cebadores				
Nombre	Especie	Diana	Secuencia (5'-3')*	Tamaño
ITS1 (s)	Universal	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Variable
ITS2DEG (as)			GCTRCGTTCTTCATCGATRC	
mtSSU_Pj1098F (s)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	mtSSU rRNA	TCATGACCCTTATGAAGTGGGC	76 pb
mtSSU_Pj1173R (as)			GCTCCGACTTCCATCATTGC	
PjF1 (s)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	mtLSU rRNA	CTGTTTCCCTTTCGACTATCTACCTT	121 pb
PjR1 (as)			CACTGAATATCTCGAGGGAGTATGAA	
NAD1_Pj579F (s)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	NAD1	AGCAGAAACGAATTGAGCTCCT	86 pb
NAD1_Pj664R (as)			TCGCAGCAGAATACTCAGTCAT	
CYTB_Pj241F (s)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	CYTB	ACTCCAGAATTCTCGTTTGGT	112 pb
CYTB_Pj352R (as)			TCGCTCCCCACAATGACATT	
DHPS-F (s)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	DHPS	GTTTGCCTTGGTTGCTTGGT	93 pb
DHPS-R (as)			CAGCAGTGCCCCAAATCCT	
HSP70_Pj126F (s)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	HSP70	GGAGATTTTCATCAATGGTCCTT	77 pb
HSP70_Pj202R (as)			CGGCATTGGAAACTTTAGTCC	
ITS1 (a)	Universal	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Variable ^a
NL4 (as)			GGTCCGTGTTTCAAGACGG	
RPBa (a)	Universal	RPB1	GARTGYCCDGGDCAYTTYGG	Variable ^a
RPBc (as)			CCNGCDATNTCRTRTCCATRTA	
OLE3 (a)	<i>Histoplasma capsulatum</i>	OLE	TTTAAACGAAGCCCCCACGG	464 pb
OLE4 (as)			ACCACCTCCAACAGCAGCA	
MAT1-1S (a)	<i>Histoplasma capsulatum</i>	MAT1-1	CGTGGTTAGTTACGGAGGCA	440 pb
MAT1-1AS (as)			TGAGGATGCGAGTGATGGGA	
MAT1-2S (a)	<i>Histoplasma capsulatum</i>	MAT1-2	ACACAGTAGCCCAACCTCTC	528 pb
MAT1-2AS (as)			TCGACAATCCCATCCAATACCG	

s: sentido; as: antisentido; pb: pares de bases nucleotídicas.

*Las posiciones degeneradas se encuentran señaladas en negrita.

^a1225 pb (ITS1-5.8S-ITS2-D1D2) y 877 pb (RPB1) en *H. capsulatum*.

Sondas			
Nombre	Especie	Diana	Secuencia (5'-3')*
PanAspDeg	<i>Aspergillus</i> spp.	ITS1	AACCTCCCACCCGTGWCTAYYGTACC-ROX-BHQ2
PanRhiz	<i>Rhizopus oryzae</i> <i>Rhizopus microsporus</i>	ITS1	TTCTGGGGTTTGATCGATGCCA-HEX-BHQ1
PanMuc	<i>Mucor</i> spp.	ITS1	GGCTTGGTATCCTATTATTATTTACCAAAAAGAATT- HEX-BHQ1
PanHBP	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	ITS1	TCGGCGGGCCTGCAGCG-Cy5-BHQ2
PanCocci	<i>Coccidioides</i> spp.	ITS1	CGGCCTGCCAGYGGATCAATT-Cy5-BHQ2
mtSSU_P1125P	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>mtSSU rRNA</i>	ACGTGCTGCAAAATTTCTACAATGGG-FAM-BHQ1
PjSL	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>mtLSU rRNA</i>	TCGCACATAGTCTGATTAT-FAM-MGB
NAD1_Pj608P	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>NAD1</i>	TGCCAGAAGCTGAATCCGAATTAGTTGC-FAM-BHQ1
CYTB_Pj302P	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>CYTB</i>	CTTTCTTGGGATATGTTCTGCC-HEX-BHQ1
DHPS-probe	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>DHPS</i>	AGATTTACAGGGTGTCTTAC-FAM-MGB
HSP70_Pj157P	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>HSP70</i>	AAGGAGGTGGCAGAAGCGTA-FAM-BHQ1

*Las posiciones degeneradas se encuentran señaladas en negra.

ANEXO II: LISTADO DE CEPAS EMPLEADAS

Nombre	Especie	Origen	Colección
CNM-CM 1722	<i>Actinomucor elegans</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3509	<i>Aspergillus flavus</i>	Clínico	CNM-SM
Af293	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Clínico	CNRMA
CNM-CM 2580 ATCC 204305	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CM 6069	<i>Aspergillus lentulus</i>	Clínico	CNM-SM
CNRMA 15.743	<i>Aspergillus niger</i>	Clínico	CNRMA
CNM-CM 4352	<i>Aspergillus niger</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6098	<i>Aspergillus novofumigatus</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3508	<i>Aspergillus terreus</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 4212	<i>Aspergillus ustus</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 5623	<i>Aspergillus viridinutans</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3113 ATCC 26199	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CM 3114 ATCC 56220	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CM 3115 ATCC 18187	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNRMA 16.324	<i>Candida glabrata</i>	Clínico	CNRMA
CNM-CL 726 ATCC 64551	<i>Candida albicans</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CL 8701	<i>Candida albicans</i>	Clínico	CNM-SM
CNRMA 16.291	<i>Candida albicans</i>	Clínico	CNRMA
CNM-CL 1787 ATCC 90030	<i>Candida glabrata</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CL 7523	<i>Candida glabrata</i>	Clínico	CNM-SM
CNRMA 16.324	<i>Candida glabrata</i>	Clínico	CNRMA
CNM-CL 7127	<i>Candida guilliermondii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CL 199 ATCC 28838	<i>Candida kefyr</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CL 1258 ATCC 6258	<i>Candida krusei</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CL 7057	<i>Candida krusei</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CL 1258 ATCC 6258	<i>Candida krusei</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CL 1844	<i>Candida lusitane</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CL 6328 ATCC 96139	<i>Candida orthopsilosis</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CL 5683	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	CNM-SM

Nombre	Especie	Origen	Colección
CNM-CL 1789 ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	Clínico	CNM-SM ATCC
CNM-CL 8796	<i>Candida tropicalis</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7325	<i>Coccidioides immitis</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2911	<i>Coccidioides posadasii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CL 5007	<i>Cryptococcus gattii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CL 212	<i>Cryptococcus gattii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CL 5801	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Clínico	CNM-SM
CNRMA 16.024	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Clínico	CNRMA
ATCC 90112	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Clínico	ATCC
CECT 1078	<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i>	Clínico	CECT
CNM-CM 7046	<i>Cunninghamella elegans</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3197	<i>Fusarium oxysporum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3530	<i>Fusarium solani</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2721	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 1006	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 1049	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 1547	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 1711	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 1712	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 1713	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2028	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2075	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2290	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2462	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2721	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2854	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2905	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2906	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2907	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3036	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3153	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3221	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3576	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 4892	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 4921	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 5659	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 5678	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 5679	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 5692	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 5731	<i>Histoplasma capsulatum var. capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM

Nombre	Especie	Origen	Colección
CNM-CM 5787	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6015	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6066	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6305	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6306	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6307	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6408	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6409	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6556	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7057	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7441	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7450	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7514	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7717	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CNM-SM
CBS 287.54	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Clínico	CBS
CBS 136.72	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Ambiental	CBS
CNM-CM 4626	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 5788	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7001	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7704	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7767	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 8013	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	CNM-SM
ATCC 24295	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	ATCC
CBS 215.53	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	CBS
CBS 175.57	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	CBS
CBS 114388	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Clínico	CBS
CBS 536.84	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>farcinosum</i>	Clínico	CBS
CNM-CM 7053	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7130	<i>Lichtheimia ramosa</i>	Clínico	CNM-SM
CNRMA 15.762	<i>Malassezia furfur</i>	Clínico	CNRMA
CNM-CM 3578	<i>Microsporium canis</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2437	<i>Mucor circinelloides</i>	Clínico	CNM-SM
CNRMA16.241	<i>Mucor circinelloides</i>	Clínico	CNRMA
CNM-CM 3112	<i>Mucor circinelloides</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7301	<i>Mucor irregularis</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 5245	<i>Mucor plumbeus</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6560	<i>Mucor velutinosus</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2270	<i>Neosartorya pseudofischeri</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 6056	<i>Neosartorya udagawae</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2908	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Clínico	CNM-SM

Nombre	Especie	Origen	Colección
CNM-CM 7192	<i>Penicillium commune</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 2751	<i>Rhizomucor pusillus</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3020	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 4244	<i>Rhizopus microsporus</i>	Clínico	CNM-SM
CNRMA14.351	<i>Rhizopus microsporus</i>	Clínico	CNRMA
CNM-CL 2671	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 3169	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7274	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7095	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 1627	<i>Scedosporium prolificans</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CL 182	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7229	<i>Sporothrix globosa</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7111	<i>Sporothrix schenkii</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 7576	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Clínico	CNM-SM
CNM-CM 10	<i>Trichophyton rubrum</i>	Clínico	CNM-SM
CBS2479	<i>Trichosporon asahii</i>	Clínico	CBS
CNM-CL 3736	<i>Trichosporon dermatitis</i>	Clínico	CNM-SM

CNM-SM: Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España; **CNRMA:** National Reference Center for Invasive Mycoses and Antifungals, Institut Pasteur, París, Francia; **ATCC:** American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos; **CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo, Parc Científic Universitat de València, Universidad de Valencia, Valencia, España; **CBS:** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Utrecht, Holanda.

ANEXO III: LISTADO DE LOS NÚMEROS DE ACCESO A GENBANK Y CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIAS DE *Histoplasma capsulatum*

Cepa	Variedad	Origen clínico [#]	Origen geográfico	Diana	Nº acceso Genbank
CNM-CM 2721	<i>Hcc</i>	Adenopatía	Ecuador	ITS	KR674032
ATCC 24295	<i>Hcd</i>	Herida	Guinea-Liberia	ITS	KR674032
CNM-CM 5731	<i>Hcc</i>	BAS	Ecuador	ITS	KR674032
CNM-CM 5788	<i>Hcd</i>	Biopsia	África	ITS	KR674032
CBS 136.72	<i>Hcc</i>	Suelo (ambiental)	Arkansas (EEUU)	ITS	KR674032
CBS 536.84	<i>Hcf</i>	Herida (caballo)	Egipto	ITS	KR674032
CNM-CM 1006	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645968
CNM-CM 1049	<i>Hcc</i>	Senos paranasales	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645969
CNM-CM 1547	<i>Hcc</i>	Hemo-cultivo	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645970
CNM-CM 1711	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645971
CNM-CM 1712	<i>Hcc</i>	LCR	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645972
CNM-CM 1713	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645973
CNM-CM 2028	<i>Hcc</i>	Biopsia hígado	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645974
CNM-CM 2075	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645975
CNM-CM 2290	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645976
CNM-CM 2462	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645977
CNM-CM 2721	<i>Hcc</i>	Adenopatía	Ecuador	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645978
CNM-CM 2854	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645979
CNM-CM 2905	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645980
CNM-CM 2906	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645981
CNM-CM 2907	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645982
CNM-CM 3036	<i>Hcc</i>	Biopsia hígado	América del sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645983

Anexo III

Cepa	Variedad	Origen clínico [#]	Origen geográfico	Diana	Nº acceso Genbank
CNM-CM 3153	<i>Hcc</i>	LBA	Ecuador	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645984
CNM-CM 3221	<i>Hcc</i>	MO	Ecuador	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645985
CNM-CM 3576	<i>Hcc</i>	LBA	Colombia	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645986
ATCC 24295	<i>Hcd</i>	Herida	Liberia	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645987
CNM-CM 4892	<i>Hcc</i>	Biopsia nódulo	Colombia	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645988
CNM-CM 4921	<i>Hcc</i>	Raspado párpado	Paraguay	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645989
CNM-CM 5659	<i>Hcc</i>	MO	América del Sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645990
CNM-CM 5678	<i>Hcc</i>	Biopsia adenopatía	Ecuador	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645991
CNM-CM 5679	<i>Hcc</i>	MO	Méjico	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645992
CNM-CM 5692	<i>Hcc</i>	LBA	Méjico	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645993
CNM-CM 5731	<i>Hcc</i>	BAS	Ecuador	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645994
CNM-CM 5787	<i>Hcc</i>	Biopsia dedo	Ecuador	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645995
CNM-CM 5788	<i>Hcd</i>	Biopsia	África	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645996
CNM-CM 6015	<i>Hcc</i>	Biopsia	Perú	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645997
CNM-CM 6066	<i>Hcc</i>	MO	Ecuador	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645998
CNM-CM 6305	<i>Hcc</i>	Biopsia intestinal	Ecuador	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX645999
CNM-CM 6306	<i>Hcc</i>	MO	Argentina	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646000
CNM-CM 6307	<i>Hcc</i>	ND	Paraguay	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646001
CNM-CM 6408	<i>Hcc</i>	MO	Panamá	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646002
CNM-CM 6409	<i>Hcc</i>	LBA	Panamá	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646003
CNM-CM 6556	<i>Hcc</i>	ND	Venezuela	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646004
CNM-CM 7001	<i>Hcd</i>	Biopsia nódulo	Guinea Ecuatorial	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646005

Cepa	Variedad	Origen clínico [#]	Origen geográfico	Diana	Nº acceso Genbank
CNM-CM 7057	<i>Hcc</i>	LCR	América del Sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646006
CBS 215.53	<i>Hcd</i>	ND	ND	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646007
CBS 175.57	<i>Hcd</i>	Úlcera rodilla	Senegal	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646008
CBS 287.54	<i>Hcc</i>	ND	Sudáfrica	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646009
CBS 136.72	<i>Hcc</i>	Suelo (ambiental)	Arkansas (EEUU)	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646010
CNM-CM 7441	<i>Hcc</i>	Biopsia amígdala	Uruguay	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646011
CNM-CM 7450	<i>Hcc</i>	Biopsia pulmón	Ecuador	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646012
CNM-CM 7514	<i>Hcc</i>	ND	América del Sur	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646013
CNM-CM 7704	<i>Hcd</i>	BAS	Ghana	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646014
CNM-CM 7717	<i>Hcc</i>	MO	Méjico	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646015
CNM-CM 7767	<i>Hcd</i>	Aspirado nódulo	Nigeria	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646016
CNM-CM 8013	<i>Hcd</i>	Biopsia cutánea	Ghana	ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	KX646017
CNM-CM 1049	<i>Hcc</i>	Senos paranasales	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646019
CNM-CM 1547	<i>Hcc</i>	Hemo-cultivo	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646020
CNM-CM 1711	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646021
CNM-CM 1712	<i>Hcc</i>	LCR	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646022
CNM-CM 1713	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646023
CNM-CM 2028	<i>Hcc</i>	Biopsia hígado	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646024
CNM-CM 2075	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646025
CNM-CM 2290	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646026
CNM-CM 2462	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646027
CNM-CM 2721	<i>Hcc</i>	Adenopatía	Ecuador	<i>RPB1</i>	KX646028
CNM-CM 2854	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646029
CNM-CM 2905	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	<i>RPB1</i>	KX646030
CNM-CM 2906	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	<i>RPB1</i>	KX646031
CNM-CM 2907	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	<i>RPB1</i>	KX646032
CNM-CM 3036	<i>Hcc</i>	Biopsia hígado	América del sur	<i>RPB1</i>	KX646033
CNM-CM 3153	<i>Hcc</i>	LBA	Ecuador	<i>RPB1</i>	KX646034
CNM-CM 3221	<i>Hcc</i>	MO	Ecuador	<i>RPB1</i>	KX646035

Anexo III

Cepa	Variedad	Origen clínico [#]	Origen geográfico	Diana	Nº acceso Genbank
CNM-CM 3576	<i>Hcc</i>	LBA	Colombia	<i>RPB1</i>	KX646036
ATCC 24295	<i>Hcd</i>	Herida	Liberia	<i>RPB1</i>	KX646037
CNM-CM 4892	<i>Hcc</i>	Biopsia nódulo	Colombia	<i>RPB1</i>	KX646038
CNM-CM 4921	<i>Hcc</i>	Raspado párpado	Paraguay	<i>RPB1</i>	KX646039
CNM-CM 5659	<i>Hcc</i>	MO	América del Sur	<i>RPB1</i>	KX646040
CNM-CM 5678	<i>Hcc</i>	Biopsia adenopatía	Ecuador	<i>RPB1</i>	KX646041
CNM-CM 5679	<i>Hcc</i>	MO	Méjico	<i>RPB1</i>	KX646042
CNM-CM 5692	<i>Hcc</i>	LBA	Méjico	<i>RPB1</i>	KX646043
CNM-CM 5731	<i>Hcc</i>	BAS	Ecuador	<i>RPB1</i>	KX646044
CNM-CM 5787	<i>Hcc</i>	Biopsia dedo	Ecuador	<i>RPB1</i>	KX646045
CNM-CM 5788	<i>Hcd</i>	Biopsia	África	<i>RPB1</i>	KX646046
CNM-CM 6015	<i>Hcc</i>	Biopsia	Perú	<i>RPB1</i>	KX646047
CNM-CM 6066	<i>Hcc</i>	MO	Ecuador	<i>RPB1</i>	KX646048
CNM-CM 6305	<i>Hcc</i>	Biopsia intestinal	Ecuador	<i>RPB1</i>	KX646049
CNM-CM 6306	<i>Hcc</i>	MO	Argentina	<i>RPB1</i>	KX646050
CNM-CM 6307	<i>Hcc</i>	ND	Paraguay	<i>RPB1</i>	KX646051
CNM-CM 6408	<i>Hcc</i>	MO	Panamá	<i>RPB1</i>	KX646052
CNM-CM 6409	<i>Hcc</i>	LBA	Panamá	<i>RPB1</i>	KX646053
CNM-CM 6556	<i>Hcc</i>	ND	Venezuela	<i>RPB1</i>	KX646054
CNM-CM 7001	<i>Hcd</i>	Biopsia nódulo	Guinea Ecuatorial	<i>RPB1</i>	KX646055
CNM-CM 7057	<i>Hcc</i>	LCR	América del Sur	<i>RPB1</i>	KX646056
CBS 215.53	<i>Hcd</i>	ND	ND	<i>RPB1</i>	KX646057
CBS 175.57	<i>Hcd</i>	Úlcera rodilla	Senegal	<i>RPB1</i>	KX646058
CBS 287.54	<i>Hcc</i>	ND	Sudáfrica	<i>RPB1</i>	KX646059
CBS 136.72	<i>Hcc</i>	Suelo (ambiental)	Arkansas (EEUU)	<i>RPB1</i>	KX646060
CNM-CM 7441	<i>Hcc</i>	Biopsia	Uruguay	<i>RPB1</i>	KX646061
CNM-CM 7450	<i>Hcc</i>	Biopsia pulmón	Ecuador	<i>RPB1</i>	KX646062
CNM-CM 7514	<i>Hcc</i>	ND	América del Sur	<i>RPB1</i>	KX646063
CNM-CM 7704	<i>Hcd</i>	BAS	Ghana	<i>RPB1</i>	KX646064
CNM-CM 7717	<i>Hcc</i>	MO	Méjico	<i>RPB1</i>	KX646065
CNM-CM 7767	<i>Hcd</i>	Aspirado nódulo	Nigeria	<i>RPB1</i>	KX646066
CNM-CM 8013	<i>Hcd</i>	Biopsia cutánea	Ghana	<i>RPB1</i>	KX646067
CNM-CM 1006	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	<i>OLE</i>	KX646068
CNM-CM 1049	<i>Hcc</i>	Senos paranasales	América del sur	<i>OLE</i>	KX646069
CNM-CM 1547	<i>Hcc</i>	Hemo-cultivo	América del sur	<i>OLE</i>	KX646070
CNM-CM 1711	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	<i>OLE</i>	KX646071

Cepa	Variedad	Origen clínico [#]	Origen geográfico	Diana	Nº acceso Genbank
CNM-CM 1712	<i>Hcc</i>	LCR	América del sur	<i>OLE</i>	KX646072
CNM-CM 1713	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>OLE</i>	KX646073
CNM-CM 2028	<i>Hcc</i>	Biopsia hígado	América del sur	<i>OLE</i>	KX646074
CNM-CM 2075	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>OLE</i>	KX646075
CNM-CM 2290	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>OLE</i>	KX646076
CNM-CM 2462	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>OLE</i>	KX646077
CNM-CM 2721	<i>Hcc</i>	Adenopatía	Ecuador	<i>OLE</i>	KX646078
CNM-CM 2854	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	<i>OLE</i>	KX646079
CNM-CM 2905	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	<i>OLE</i>	KX646080
CNM-CM 2906	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	<i>OLE</i>	KX646081
CNM-CM 2907	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	<i>OLE</i>	KX646082
CNM-CM 3036	<i>Hcc</i>	Biopsia hígado	América del sur	<i>OLE</i>	KX646083
CNM-CM 3153	<i>Hcc</i>	LBA	Ecuador	<i>OLE</i>	KX646084
CNM-CM 3221	<i>Hcc</i>	MO	Ecuador	<i>OLE</i>	KX646085
CNM-CM 3576	<i>Hcc</i>	LBA	Colombia	<i>OLE</i>	KX646086
ATCC 24295	<i>Hcd</i>	Herida	Liberia	<i>OLE</i>	KX646087
CNM-CM 4892	<i>Hcc</i>	Biopsia nódulo	Colombia	<i>OLE</i>	KX646088
CNM-CM 4921	<i>Hcc</i>	Raspado párpado	Paraguay	<i>OLE</i>	KX646089
CNM-CM 5659	<i>Hcc</i>	MO	América del Sur	<i>OLE</i>	KX646090
CNM-CM 5678	<i>Hcc</i>	Biopsia adenopatía	Ecuador	<i>OLE</i>	KX646091
CNM-CM 5679	<i>Hcc</i>	MO	Méjico	<i>OLE</i>	KX646092
CNM-CM 5692	<i>Hcc</i>	LBA	Méjico	<i>OLE</i>	KX646093
CNM-CM 5731	<i>Hcc</i>	BAS	Ecuador	<i>OLE</i>	KX646094
CNM-CM 5787	<i>Hcc</i>	Biopsia dedo	Ecuador	<i>OLE</i>	KX646095
CNM-CM 5788	<i>Hcd</i>	Biopsia	África	<i>OLE</i>	KX646096
CNM-CM 6015	<i>Hcc</i>	Biopsia	Perú	<i>OLE</i>	KX646097
CNM-CM 6066	<i>Hcc</i>	MO	Ecuador	<i>OLE</i>	KX646098
CNM-CM 6305	<i>Hcc</i>	Biopsia intestinal	Ecuador	<i>OLE</i>	KX646099
CNM-CM 6306	<i>Hcc</i>	MO	Argentina	<i>OLE</i>	KX646100
CNM-CM 6307	<i>Hcc</i>	ND	Paraguay	<i>OLE</i>	KX646101
CNM-CM 6408	<i>Hcc</i>	MO	Panamá	<i>OLE</i>	KX646102
CNM-CM 6409	<i>Hcc</i>	LBA	Panamá	<i>OLE</i>	KX646103
CNM-CM 6556	<i>Hcc</i>	ND	Venezuela	<i>OLE</i>	KX646104
CNM-CM 7001	<i>Hcd</i>	Biopsia nódulo	Guinea Ecuatorial	<i>OLE</i>	KX646105
CNM-CM 7057	<i>Hcc</i>	LCR	América del Sur	<i>OLE</i>	KX646106
CBS 215.53	<i>Hcd</i>	ND	ND	<i>OLE</i>	KX646107
CBS 175.57	<i>Hcd</i>	Úlcera rodilla	Senegal	<i>OLE</i>	KX646108
CBS 287.54	<i>Hcc</i>	ND	Sudáfrica	<i>OLE</i>	KX646109

Anexo III

Cepa	Variedad	Origen clínico [#]	Origen geográfico	Diana	Nº acceso Genbank
CBS 136.72	<i>Hcc</i>	Suelo (ambiental)	Arkansas (EEUU)	<i>OLE</i>	KX646110
CNM-CM 7441	<i>Hcc</i>	Biopsia amígdala	Uruguay	<i>OLE</i>	KX646111
CNM-CM 7450	<i>Hcc</i>	Biopsia pulmón	Ecuador	<i>OLE</i>	KX646112
CNM-CM 7514	<i>Hcc</i>	ND	América del Sur	<i>OLE</i>	KX646113
CNM-CM 7704	<i>Hcd</i>	BAS	Ghana	<i>OLE</i>	KX646114
CNM-CM 7717	<i>Hcc</i>	MO	Méjico	<i>OLE</i>	KX646115
CNM-CM 7767	<i>Hcd</i>	Aspirado nódulo	Nigeria	<i>OLE</i>	KX646116
CNM-CM 8013	<i>Hcd</i>	Biopsia cutánea	Ghana	<i>OLE</i>	KX646117
CNM-CM 1006	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	<i>MAT1-2</i>	KX646118
CNM-CM 1049	<i>Hcc</i>	Senos paranasales	América del sur	<i>MAT1-2</i>	KX646119
CNM-CM 1547	<i>Hcc</i>	Hemo-cultivo	América del sur	<i>MAT1-2</i>	KX646120
CNM-CM 1711	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	<i>MAT1-1</i>	KX646121
CNM-CM 1712	<i>Hcc</i>	LCR	América del sur	<i>MAT1-2</i>	KX646122
CNM-CM 1713	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>MAT1-1</i>	KX646123
CNM-CM 2028	<i>Hcc</i>	Biopsia hígado	América del sur	<i>MAT1-2</i>	KX646124
CNM-CM 2075	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>MAT1-2</i>	KX646125
CNM-CM 2290	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>MAT1-1</i>	KX646126
CNM-CM 2462	<i>Hcc</i>	LBA	América del sur	<i>MAT1-1</i>	KX646127
CNM-CM 2721	<i>Hcc</i>	Adenopatía	Ecuador	<i>MAT1-1</i>	KX646128
CNM-CM 2854	<i>Hcc</i>	MO	América del sur	<i>MAT1-2</i>	KX646129
CNM-CM 2905	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	<i>MAT1-2</i>	KX646130
CNM-CM 2906	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	<i>MAT1-2</i>	KX646131
CNM-CM 2907	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	<i>MAT1-1</i>	KX646132
CNM-CM 3036	<i>Hcc</i>	Biopsia hígado	América del sur	<i>MAT1-2</i>	KX646133
CNM-CM 3153	<i>Hcc</i>	LBA	Ecuador	<i>MAT1-2</i>	KX646134
CNM-CM 3221	<i>Hcc</i>	MO	Ecuador	<i>MAT1-1</i>	KX646135
CNM-CM 3576	<i>Hcc</i>	LBA	Colombia	<i>MAT1-1</i>	KX646136
ATCC 24295	<i>Hcd</i>	Herida	Liberia	<i>MAT1-2</i>	KX646137
CNM-CM 4892	<i>Hcc</i>	Biopsia nódulo	Colombia	<i>MAT1-2</i>	KX646138
CNM-CM 4921	<i>Hcc</i>	Raspado párpado	Paraguay	<i>MAT1-1</i>	KX646139
CNM-CM 5659	<i>Hcc</i>	MO	América del Sur	<i>MAT1-1</i>	KX646140
CNM-CM 5678	<i>Hcc</i>	Biopsia adenopatía	Ecuador	<i>MAT1-1</i>	KX646141
CNM-CM 5679	<i>Hcc</i>	MO	Méjico	<i>MAT1-2</i>	KX646142
CNM-CM 5692	<i>Hcc</i>	LBA	Méjico	<i>MAT1-2</i>	KX646143
CNM-CM 5731	<i>Hcc</i>	BAS	Ecuador	<i>MAT1-1</i>	KX646144
CNM-CM 5787	<i>Hcc</i>	Biopsia dedo	Ecuador	<i>MAT1-1</i>	KX646145

Cepa	Variedad	Origen clínico [#]	Origen geográfico	Diana	Nº acceso Genbank
CNM-CM 5788	<i>Hcd</i>	Biopsia	África	<i>MAT1-2</i>	KX646146
CNM-CM 6015	<i>Hcc</i>	Biopsia	Perú	<i>MAT1-1</i>	KX646147
CNM-CM 6066	<i>Hcc</i>	MO	Ecuador	<i>MAT1-1</i>	KX646148
CNM-CM 6305	<i>Hcc</i>	Biopsia intestinal	Ecuador	<i>MAT1-1</i>	KX646149
CNM-CM 6306	<i>Hcc</i>	MO	Argentina	<i>MAT1-1</i>	KX646150
CNM-CM 6307	<i>Hcc</i>	ND	Paraguay	<i>MAT1-1</i>	KX646151
CNM-CM 6408	<i>Hcc</i>	MO	Panamá	<i>MAT1-2</i>	KX646152
CNM-CM 6409	<i>Hcc</i>	LBA	Panamá	<i>MAT1-2</i>	KX646153
CNM-CM 6556	<i>Hcc</i>	ND	Venezuela	<i>MAT1-2</i>	KX646154
CNM-CM 7001	<i>Hcd</i>	Biopsia nódulo	Guinea Ecuatorial	<i>MAT1-2</i>	KX646155
CNM-CM 7057	<i>Hcc</i>	LCR	América del Sur	<i>MAT1-2</i>	KX646156
CBS 215.53	<i>Hcd</i>	ND	ND	<i>MAT1-2</i>	KX646157
CBS 175.57	<i>Hcd</i>	Úlcera rodilla	Senegal	<i>MAT1-2</i>	KX646158
CBS 287.54	<i>Hcc</i>	ND	Sudáfrica	<i>MAT1-1</i>	KX646159
CBS 136.72	<i>Hcc</i>	Suelo (ambiental)	Arkansas (EEUU)	<i>MAT1-2</i>	KX646160
CNM-CM 7441	<i>Hcc</i>	Biopsia	Uruguay	<i>MAT1-2</i>	KX646161
CNM-CM 7450	<i>Hcc</i>	Biopsia pulmón	Ecuador	<i>MAT1-1</i>	KX646162
CNM-CM 7514	<i>Hcc</i>	ND	América del Sur	<i>MAT1-1</i>	KX646163
CNM-CM 7704	<i>Hcd</i>	BAS	Ghana	<i>MAT1-2</i>	KX646164
CNM-CM 7717	<i>Hcc</i>	MO	Méjico	<i>MAT1-1</i>	KX646165
CNM-CM 7767	<i>Hcd</i>	Aspirado nódulo	Nigeria	<i>MAT1-1</i>	KX646166
CNM-CM 8013	<i>Hcd</i>	Biopsia cutánea	Ghana	<i>MAT1-1</i>	KX646167

Hcc: *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*; *Hcd*: *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*; *Hcf*: *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*; **BAS**: Broncoaspirado; **MO**: Médula ósea; **LCR**: Líquido Cefalorraquídeo; **LBA**: Lavado Broncoalveolar; **ND**: No Disponible.

ANEXO IV: MATERIAL SUPLEMENTARIO INCLUIDO EN LAS PUBLICACIONES

1. Valero C, Buitrago MJ, Gits-Muselli M, Benazra M, Sturny-Leclère A, Hamane S, Guigue N, Bretagne S, Alanio A. Copy number variation of mitochondrial DNA genes in *Pneumocystis jirovecii* according to the fungal load in BAL specimens. *Front Microbiol.* 2016 12;7:1413. doi: 10.3389/fmicb.2016.01413.

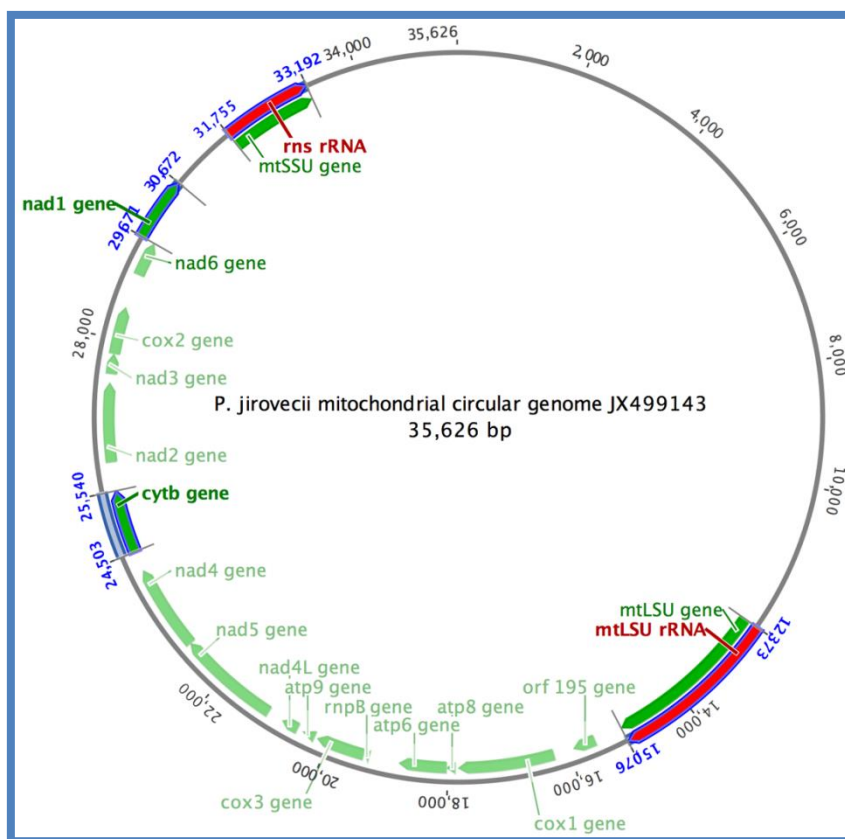


Figure S1. Genetic map of *Pneumocystis jirovecii* mtDNA based on JX499143 sequence is shown in linear configuration. *mtSSU rRNA*, *mtLSU rRNA*, *NAD1*, and *CYTB* genes are shown emphasized within the figure.

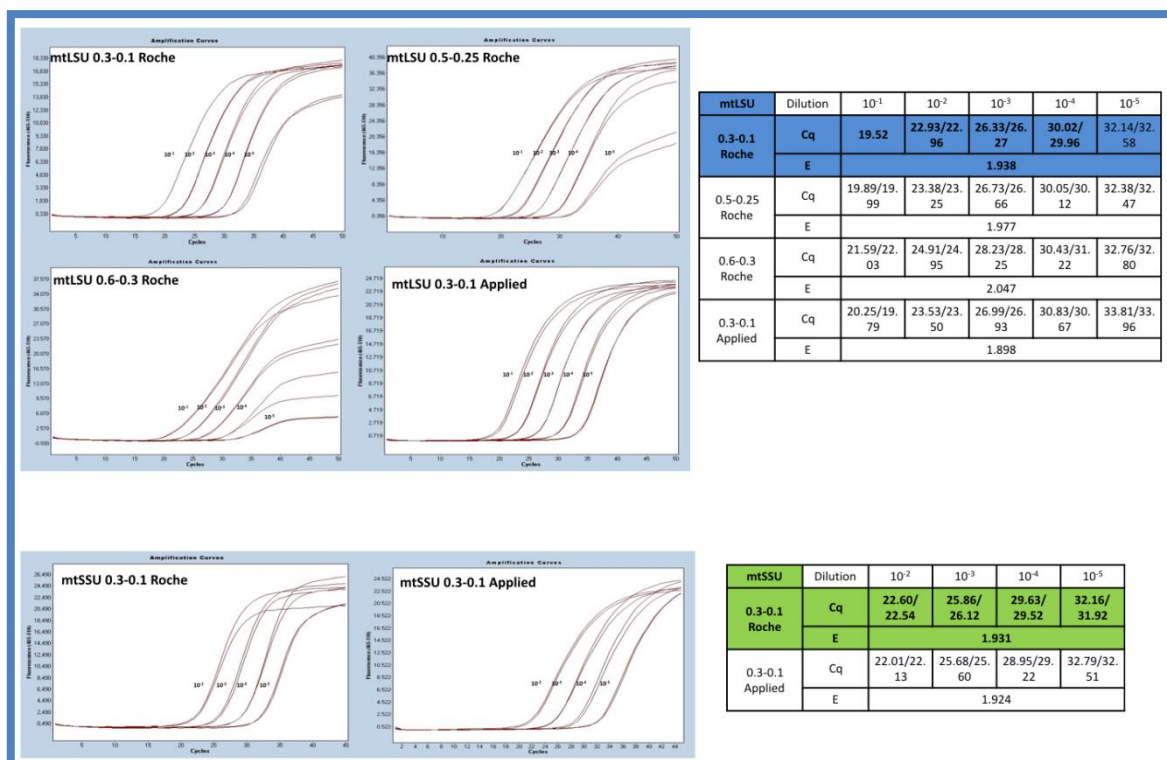


Figure S2. Optimization of qPCR assays I. *mtLSU rRNA* gene (top of the figure) was tested with Roche mastermix (LightCycler 480 Probes Master, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 0.3 mM of each primer and 0.1 mM of probe (top left panel), 0.5 mM of each primer and 0.25 mM of probe (top right panel), 0.6 mM of each primer and 0.3 mM of probe (lower left panel) and 0.3 mM of each primer and 0.1 mM of probe again but with Applied mastermix (TaqMan Universal PCR MasterMix, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) (lower right panel). *mtSSU rRNA* gene (beneath of the figure) was tested with 0.3 mM of each primer and 0.1 mM of probe with Roche (left panel) and Applied (right panel) matermixes. Cq values obtained for each dilution of positive control DNA as well as efficiency calculated with those data are represented in a table next to the panels. Optimal PCR conditions are highlighted in color.

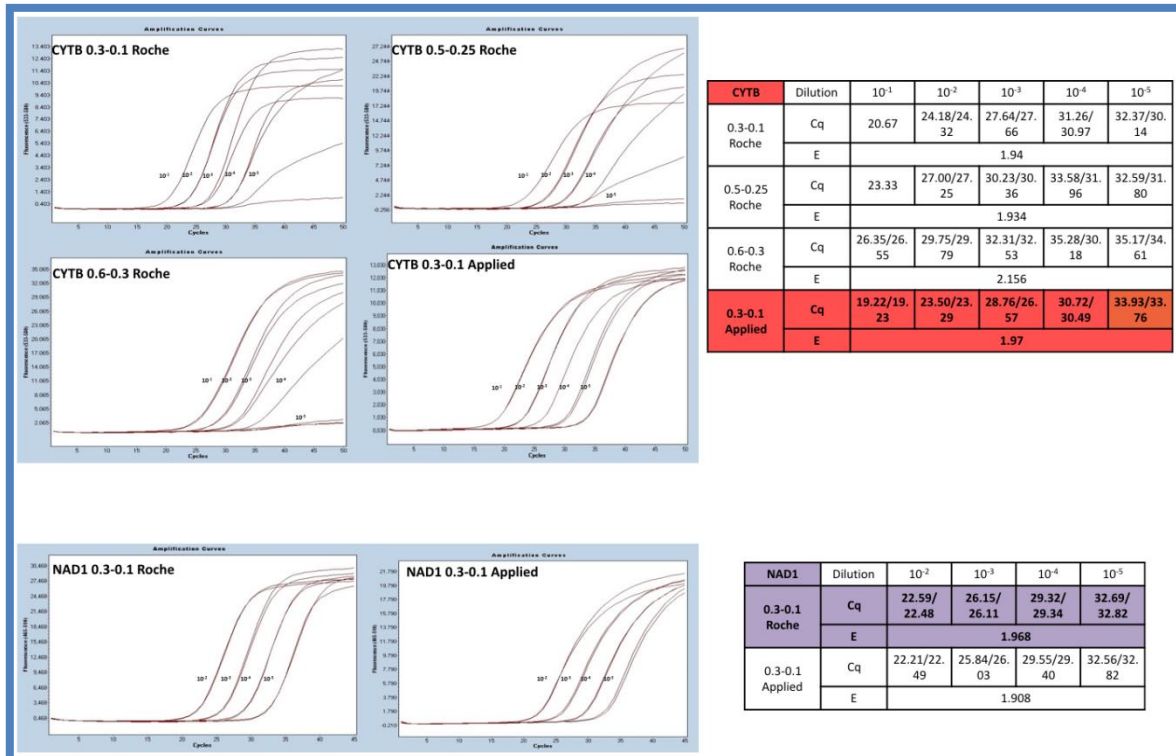


Figure S3. Optimization of qPCR assays II. *CYTB* gene (top of the figure) was tested with Roche mastermix (LightCycler 480 Probes Master, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 0.3 mM of each primer and 0.1 mM of probe (top left panel), 0.5 mM of each primer and 0.25 mM of probe (top right panel), 0.6 mM of each primer and 0.3 mM of probe (lower left panel) and 0.3 mM of each primer and 0.1 mM of probe again but with Applied mastermix (TaqMan Universal PCR MasterMix, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) (lower right panel). *NAD1* gene (beneath of the figure) was tested with 0.3 mM of each primer and 0.1 mM of probe with Roche (left panel) and Applied (right panel) matermixes. Cq values obtained for each dilution of positive control DNA as well as efficiency calculated with those data are represented in a table next to the panels. Optimal PCR conditions are highlighted in color.

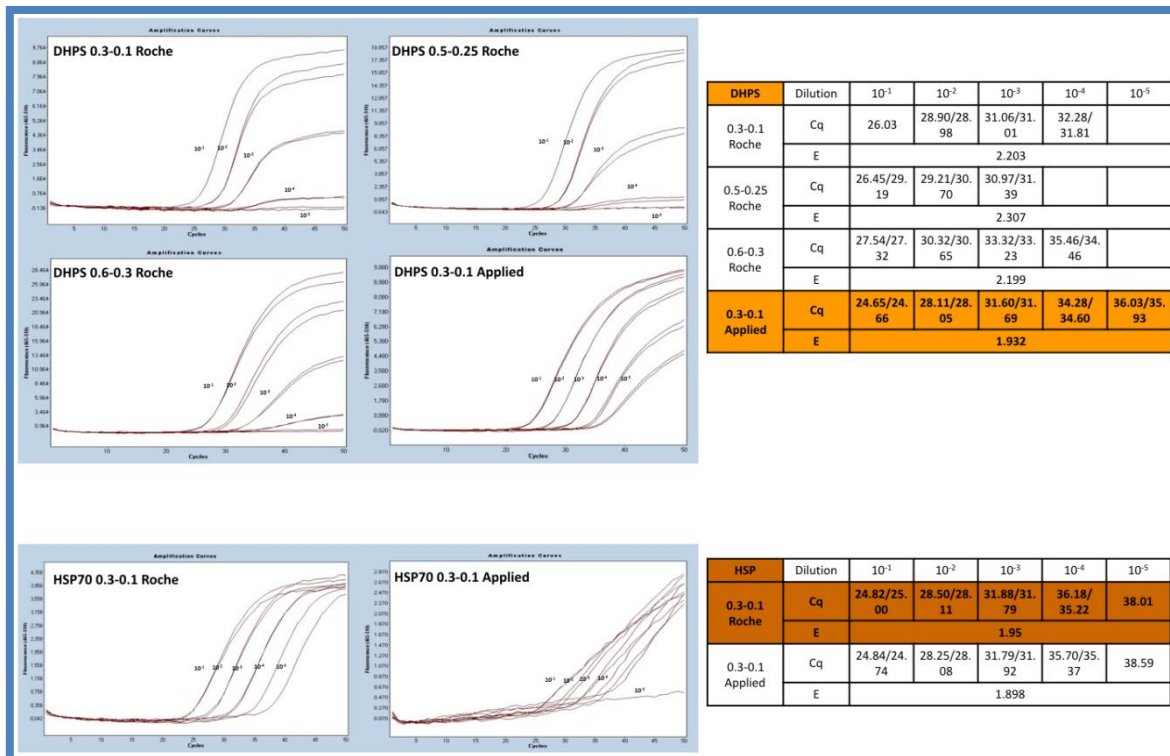


Figure S4. Optimization of qPCR assays III. *DHPS* gene (top of the figure) was tested with Roche mastermix (LightCycler 480 Probes Master, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 0.3 mM of each primer and 0.1 mM of probe (top left panel), 0.5 mM of each primer and 0.25 mM of probe (top right panel), 0.6 mM of each primer and 0.3 mM of probe (lower left panel) and 0.3 mM of each primer and 0.1 mM of probe again but with Applied mastermix (TaqMan Universal PCR MasterMix, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) (lower right panel). *HSP70* gene (beneath of the figure) was tested with 0.3 mM of each primer and 0.1 mM of probe with Roche (left panel) and Applied (right panel) mastermixes. Cq values obtained for each dilution of positive control DNA as well as efficiency calculated with those data are represented in a table next to the panels. Optimal PCR conditions are highlighted in color.

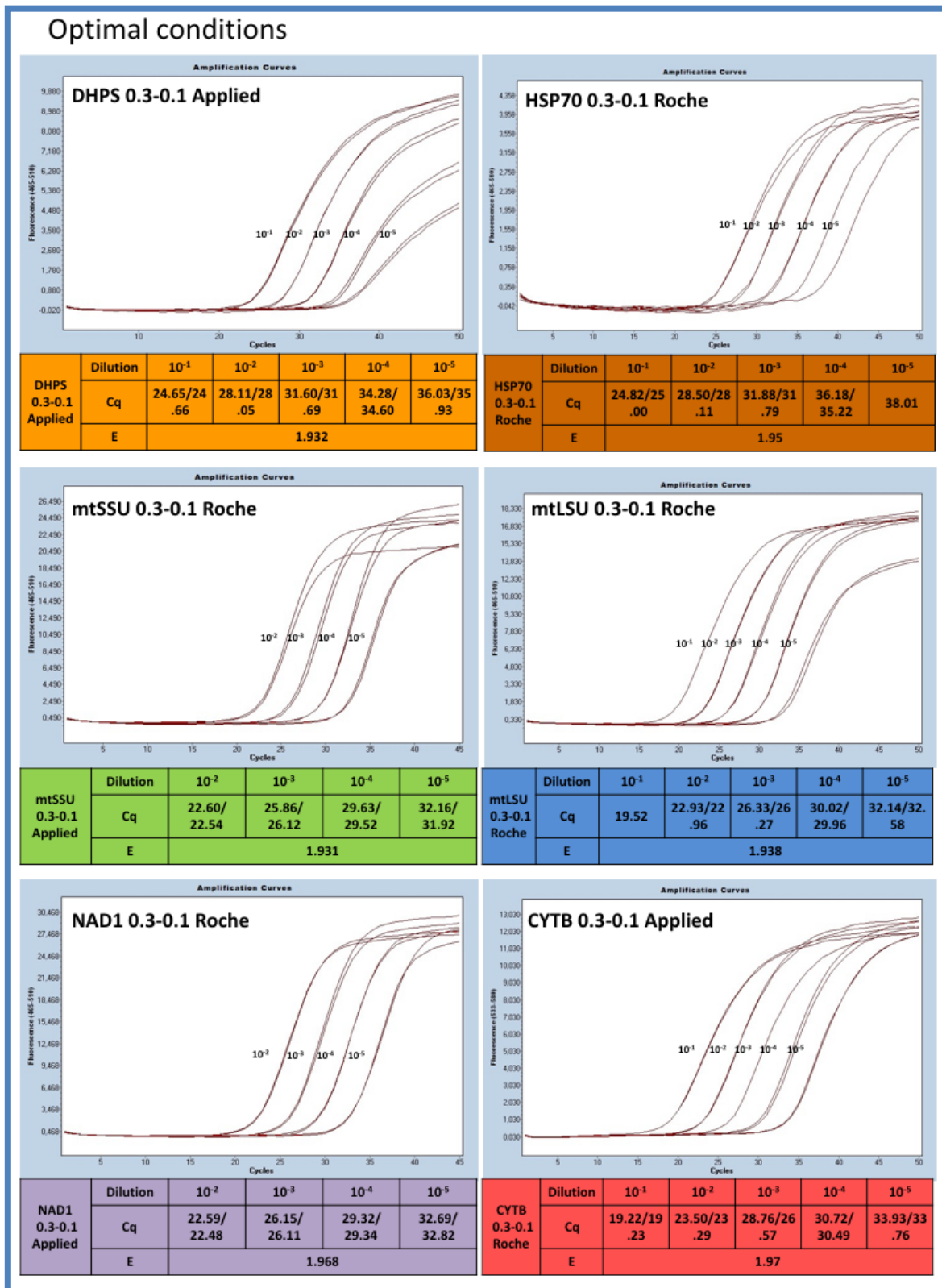


Figure S5. Optimization of qPCR assays IV. Optimal PCR conditions are shown at once.

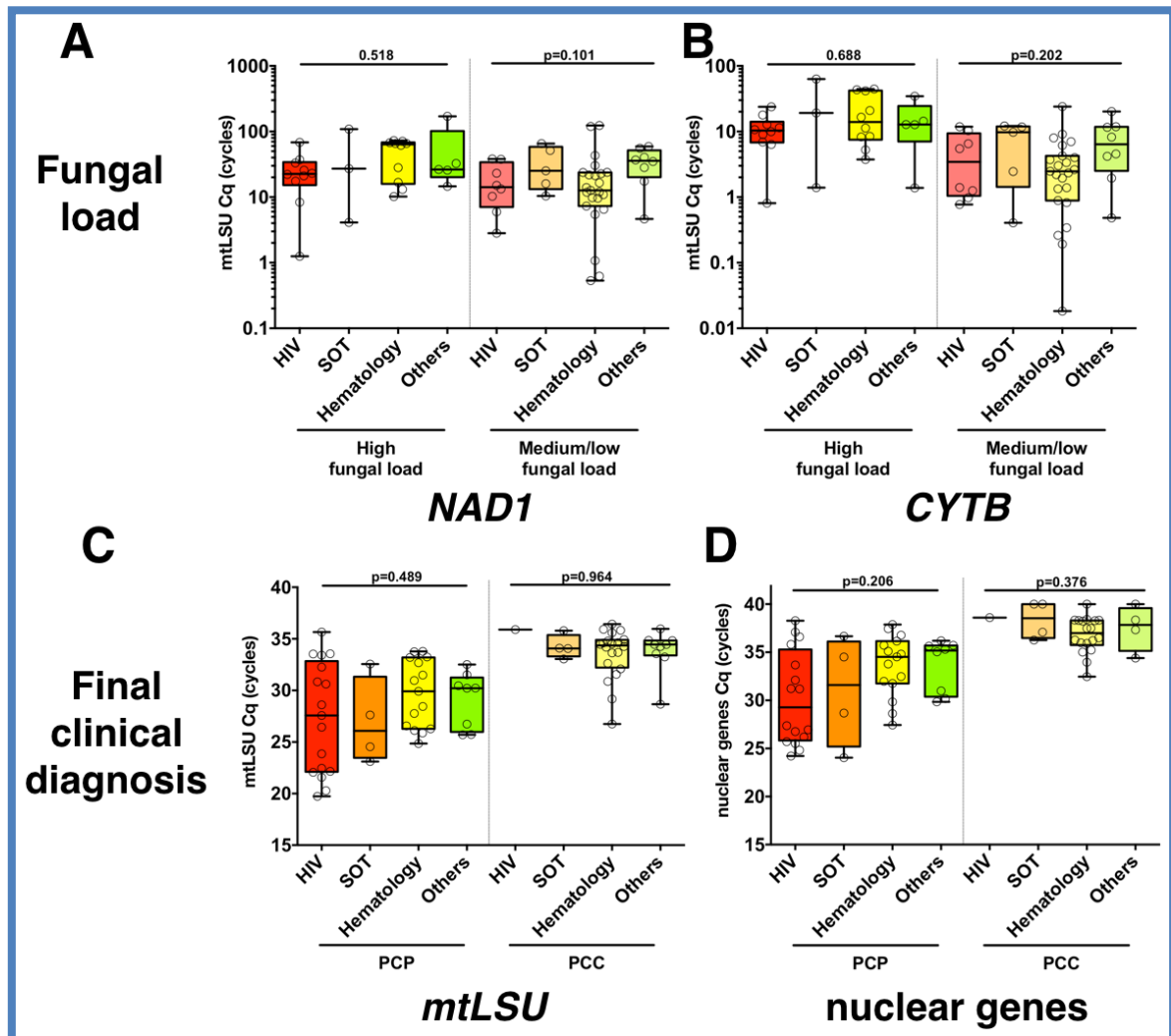


Figure S6. *Pneumocystis jirovecii* quantification regarding clinical background of patients. A) *NAD1* quantification in high fungal load samples (left) and medium/low fungal load (right). B) *CYT8* quantification in high fungal load samples (left) and medium/low fungal load (right). C) mtLSU rRNA quantification in PCP samples (left) and PCC (right). D) Nuclear genes quantification PCP samples (left) and PCC (right).

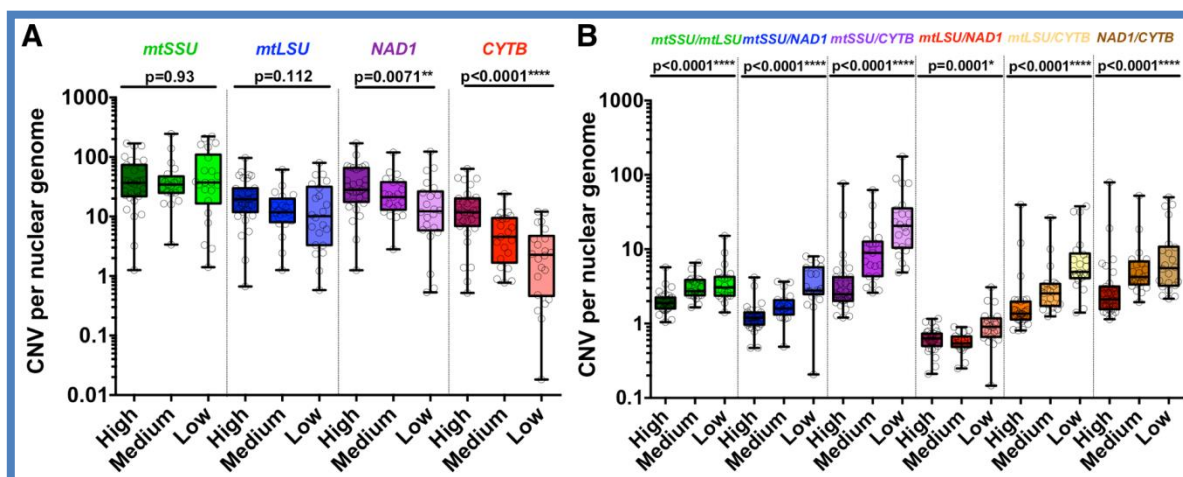


Figure S7. Copy number variation of mitochondrial genes varies according to the fungal load. **A)** CNV is significantly different in samples with high, medium and low fungal loads for *CYTB* and *NAD1* but not for *mtLSU* or *mtSSU*. **B)** All ratios of the DNA of the four mitochondrial genes are significantly different in samples with high medium or low fungal loads. *P*-values indicating the significance of the differences are indicated in the top of the figure for each category.

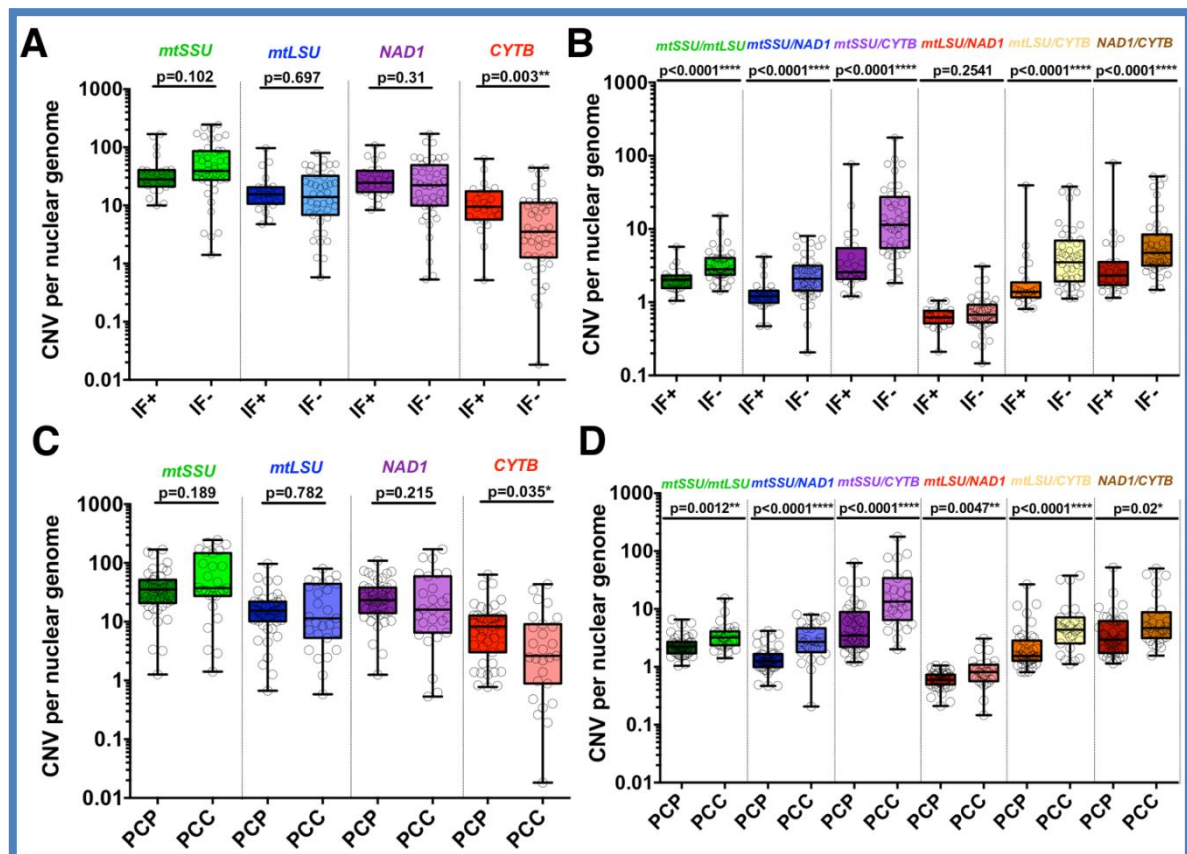


Figure S8. Copy number variation of mitochondrial gene does not vary according to immunofluorescence results and final clinical diagnosis. **A)** CNV of mitochondrial genes in IF+ and IF- samples. **B)** CNV in ratios between these mitochondrial genes in IF+ and IF- samples. **C)** CNV of mitochondrial genes in PCP and PCC samples. **D)** CNV in ratios between these mitochondrial genes in PCP and PCC samples. *P*-values indicating the significance of the differences are indicated in the top of the figure for each category.

Table S1. Sequences and targets of primers and probes used in *P. jirovecii* quantification assays and their corresponding amplicon sizes.

Primers and probes	Target	Sequence*	Amplicon size (bp)
mtSSU_Pj1098F (f) mtSSU_Pj1173R (r) mtSSU_P1125P	<i>mtSSU rRNA</i>	5'-TCATGACCCTTATGAAGTGGGC-3' 5'-GCTCCGACTTCCATCATTGC-3' 5'- FAM -ACGTGCTGCAAAATTTTCTACAATGGG-BHQ1-3'	76
PjF1 (f) PjR1 (r) PjSL	<i>mtLSU rRNA</i>	5'-CTGTTTCCCTTTCGACTATCTACCTT-3' 5'-CACTGAATATCTCGAGGGAGTATGAA-3' 5'- FAM -TCGCACATAGTCTGATTAT- MGB-3'	121
NAD1_Pj579F (f) NAD1_Pj664R (r) NAD1_Pj608P	<i>NAD1</i>	5'-AGCAGAAACGAATTGAGCTCCT-3' 5'-TCGCAGCAGAATACTCAGTCAT-3' 5'- FAM -TGCCAGAAGCTGAATCCGAATTAGTTGC-BHQ1-3'	86
CYTB_Pj241F (f) CYTB_Pj352R (r) CYTB_Pj302P	<i>CYTB</i>	5'-ACTCCCAGAATTCTCGTTTGGT-3' 5'-TCGCTCCCCACAATGACATT-3' 5'- HEX -CTTTCTTGGGATATGTTCTGCC-BHQ1-3'	112
DHPS-F (f) DHPS-R (r) DHPS-probe	<i>DHPS</i>	5'-GTTTGCCTTGGTTGCTTGGT-3' 5'-CAGCAGTGCCCCAAATCCT-3' 5'- FAM -AGATTTACAGGGTGTCTTAC- MGB-3'	93
HSP70_Pj126F (f) HSP70_Pj202R (r) HSP70_Pj157P	<i>HSP70</i>	5'-GGAGATTTTCATCAATGGTCCTT -3' 5'-CGGCATTGGAACTTTAGTCC -3' 5'- FAM -AAGGAGGTGGCAGAAGCGTA- BHQ1-3'	77

f: forward; r: reverse; **BHQ1**: black hole quencher 1; **MGB**: Minor Groove Binder.

*Probe fluorophores are detailed in bold type.

2. Valero C, Buitrago MJ, Gago S, Quiles-Melero I, García-Rodríguez J. A matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry reference database for the identification of *Histoplasma capsulatum*. *Med Mycol.* 2017.

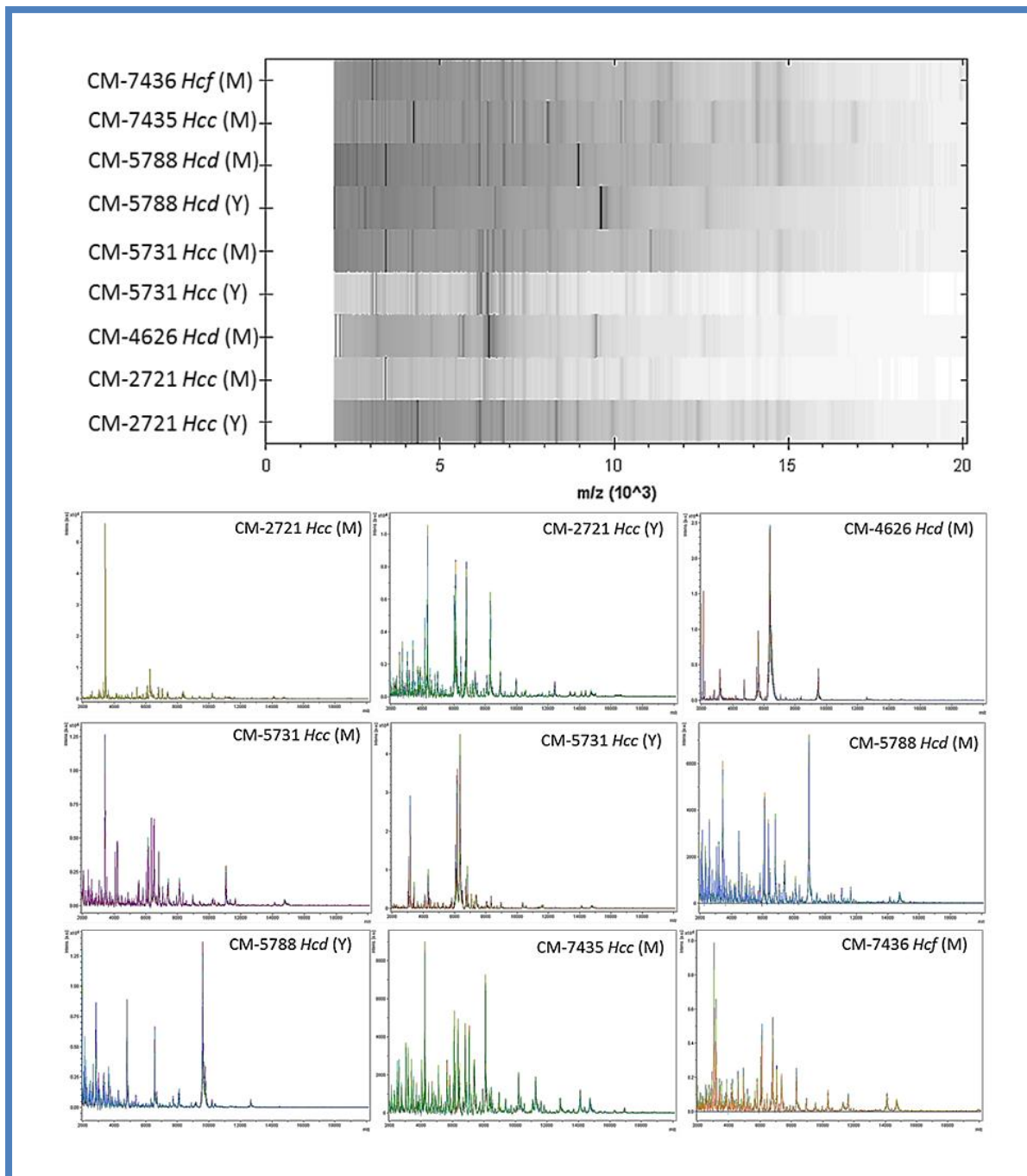


Figure S1. Virtual gels and overlying spectra of all *H. capsulatum* isolates included in the reference database. *Hcc*: *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*; *Hcd*: *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*; *Hcf*: *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*; *M*: mycelium; *Y*: yeast.

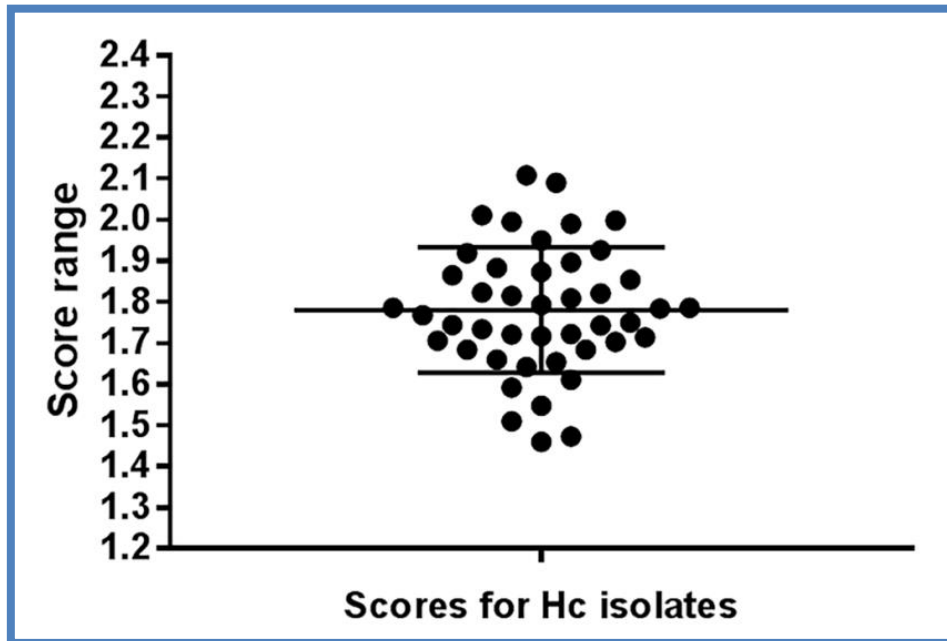


Figure S2. Frequency distribution of MALDI-ToF identification scores for *H. capsulatum* isolates (Hc scores) showing mean and standard deviations.

3. Valero C, Gago S, Monteiro MC, Alastruey-Izquierdo A, Buitrago MJ. African histoplasmosis: new clinical and microbiological insights. *Med Mycol.* 2017. doi: 10.1093/mmy/myx020.

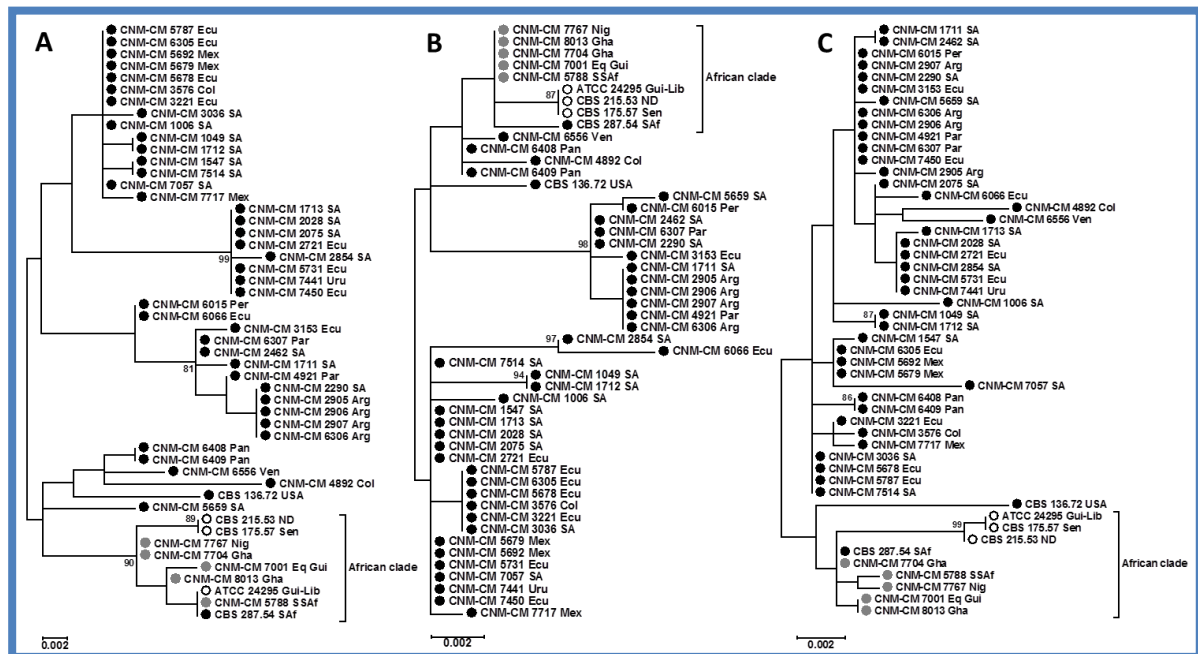


Fig. S1. Individual molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood (ML) method of the three loci included in the MLSA. Trees are drawn to scale, with branch lengths measured by the number of substitutions per site. Trees with the highest log likelihood are shown. Only bootstrap values above 80% are indicated. **A)** ML tree based on the Tamura-Nei model from analysis of the ITS-5.8S-ITS2-D1D2 region. **B)** ML tree based on the Kimura 2- parameter model from analysis of the partial region of *RPB1* gene; **C)** ML tree based on the Kimura 2-parameter model from analysis of the partial region of *OLE* gene. *Hcc* strains are indicated using black-filled circles, *Hcd* with empty circles and AS with grey-filled circles. The letter code placed next to strain designations is the same for Fig. 2 and Fig. 3.

Table S1. Details of all available clinical and epidemiological data of 50 *H. capsulatum* strains included in the study.

Strain	ID ^a	Sample origin	Geographical origin	Notes
CNM-CM 1006	<i>Hcc</i>	Bone marrow	South America	
CNM-CM 1049	<i>Hcc</i>	Paranasal sinuses	South America	
CNM-CM 1547	<i>Hcc</i>	Blood culture	South America	
CNM-CM 1711	<i>Hcc</i>	Bone marrow	South America	
CNM-CM 1712	<i>Hcc</i>	CSF	South America	
CNM-CM 1713	<i>Hcc</i>	BAL	South America	
CNM-CM 2028	<i>Hcc</i>	Liver biopsy	South America	
CNM-CM 2075	<i>Hcc</i>	BAL	South America	
CNM-CM 2290	<i>Hcc</i>	BAL	South America	
CNM-CM 2462	<i>Hcc</i>	BAL	South America	
CNM-CM 2721	<i>Hcc</i>	Cervical adenopathy	Ecuador	
CNM-CM 2854	<i>Hcc</i>	Bone marrow	South America	
CNM-CM 2905	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	
CNM-CM 2906	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	
CNM-CM 2907	<i>Hcc</i>	ND	Argentina	
CNM-CM 3036	<i>Hcc</i>	Liver biopsy	South America	
CNM-CM 3153	<i>Hcc</i>	BAL	Ecuador	
CNM-CM 3221	<i>Hcc</i>	Bone marrow	Ecuador	
CNM-CM 3576	<i>Hcc</i>	BAL	Colombia	
CNM-CM 4892	<i>Hcc</i>	Lymph node biopsy	Colombia	
CNM-CM 4921	<i>Hcc</i>	Eyelid scraped	Paraguay	
CNM-CM 5659	<i>Hcc</i>	Bone marrow	South America	
CNM-CM 5678	<i>Hcc</i>	Adenopathy biopsy	Ecuador	
CNM-CM 5679	<i>Hcc</i>	Bone marrow	Mexico	
CNM-CM 5692	<i>Hcc</i>	BAL	Mexico	
CNM-CM 5731	<i>Hcc</i>	BAS	Ecuador	
CNM-CM 5787	<i>Hcc</i>	Finger biopsy	Ecuador	Accidental puncture (CNM-CM 5678)
CNM-CM 5788	AS	Biopsy	Africa	Patient 5
CNM-CM 6015	<i>Hcc</i>	Biopsy	Peru	
CNM-CM 6066	<i>Hcc</i>	Bone marrow	Ecuador	
CNM-CM 6305	<i>Hcc</i>	Intestinal biopsy	Ecuador	
CNM-CM 6306	<i>Hcc</i>	Bone marrow	Argentina	
CNM-CM 6307	<i>Hcc</i>	ND	Paraguay	
CNM-CM 6408	<i>Hcc</i>	Bone marrow	Panama	Same patient as CNM-CM 6409
CNM-CM 6409	<i>Hcc</i>	BAL	Panama	Same patient as CNM-CM 6408
CNM-CM 6556	<i>Hcc</i>	ND	Venezuela	
CNM-CM 7001	AS	Node biopsy	Equatorial Guinea	Patient 8

Strain	ID ^a	Sample origin	Geographical origin	Notes
CNM-CM 7057	<i>Hcc</i>	CSF	South America	
CNM-CM 7441	<i>Hcc</i>	Tonsil biopsy	Uruguay	
CNM-CM 7450	<i>Hcc</i>	Lung biopsy	Ecuador	
CNM-CM 7514	<i>Hcc</i>	ND	South America	
CNM-CM 7704	AS	Bronchial aspirate	Ghana	Patient 11
CNM-CM 7717	<i>Hcc</i>	Bone marrow	Mexico	
CNM-CM 7767	AS	Lymph node aspirate	Nigeria	Patient 12
CNM-CM 8013	AS	Skin biopsy	Ghana	Patient 13
ATCC 24295	<i>Hcd</i>	Human leg	Guinea-Liberia border	
CBS 215.53	<i>Hcd</i>	ND	ND	
CBS 175.57	<i>Hcd</i>	Knee ulceration	Senegal	
CBS 287.54	<i>Hcc</i>	ND	South Africa	
CBS 136.72	<i>Hcc</i>	Soil	Arkansas	Type Strain

^aStrains from international culture collections were classified as *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (*Hcc*) or *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* (*Hcd*) based on the classification made by those organisms whereas CNM strains with American origin were classified as *Hcc* and strains isolated from patients diagnosed at CNM with African origin were named generically as African strains (AS).

ID: identification; **ATCC:** American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA); **CBS:** Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands).

Table S2. Characteristics of primers used in multi-locus sequence analysis (MLSA).

Target	Primer	Sequence	Annealing T (°C)	Amplicon size
ITS1-5.8S-ITS2-D1D2	ITS1 (f) NL4 (r)	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	56	1225 bp
<i>RRB1</i>	RPBa (f) RPBc (r)	5'-GARTGYCCDGGDCAYTTYGG-3' 5'-CCNGCDATNTCRTRTCCATRTA-3'	58	877 bp
<i>OLE</i> ³⁷	OLE319 (f) OLE419 (r)	5'-TTTAAACGAAGCCCCACGG-3' 5'-CACCACCTCCAACAGCAGCA-3'	58	464 bp
<i>MAT1</i> ²⁰	MAT1-1S (f) MAT1-1AS (r)	5'-CGTGGTTAGTTACGGAGGCA-3' 5'-TGAGGATGCGAGTGATGGGA-3'	58	412 bp
	MAT1-2S (f) MAT1-2AS (r)	5'-ACACAGTAGCCCAACCTCTC-3' 5'-TCGACAATCCCATCCAATACCG-3'	58	573 bp

f: forward; **r:** reverse; **T:** Temperature

³⁷Kasuga T, 1999

²⁰Rodríguez-Arellanes G, 2013

Table S3. Genbank accession number database of *H. capsulatum* sequences analyzed in this study.

Genbank accession number	Strain
<i>ITS-5.8S-ITS2-D1D2 sequences</i>	
KX645968	CNM-CM 1006
KX645969	CNM-CM 1049
KX645970	CNM-CM 1547
KX645971	CNM-CM 1711
KX645972	CNM-CM 1712
KX645973	CNM-CM 1713
KX645974	CNM-CM 2028
KX645975	CNM-CM 2075
KX645976	CNM-CM 2290
KX645977	CNM-CM 2462
KX645978	CNM-CM 2721
KX645979	CNM-CM 2854
KX645980	CNM-CM 2905
KX645981	CNM-CM 2906
KX645982	CNM-CM 2907
KX645983	CNM-CM 3036
KX645984	CNM-CM 3153
KX645985	CNM-CM 3221
KX645986	CNM-CM 3576
KX645987	ATCC 24295
KX645988	CNM-CM 4892
KX645989	CNM-CM 4921
KX645990	CNM-CM 5659
KX645991	CNM-CM 5678
KX645992	CNM-CM 5679
KX645993	CNM-CM 5692
KX645994	CNM-CM 5731
KX645995	CNM-CM 5787
KX645996	CNM-CM 5788
KX645997	CNM-CM 6015
KX645998	CNM-CM 6066
KX645999	CNM-CM 6305
KX646000	CNM-CM 6306
KX646001	CNM-CM 6307
KX646002	CNM-CM 6408

KX646003	CNM-CM 6409
KX646004	CNM-CM 6556
KX646005	CNM-CM 7001
KX646006	CNM-CM 7057
KX646007	CBS 215.53
KX646008	CBS 175.57
KX646009	CBS 287.54
KX646010	CBS 136.72
KX646011	CNM-CM 7441
KX646012	CNM-CM 7450
KX646013	CNM-CM 7514
KX646014	CNM-CM 7704
KX646015	CNM-CM 7717
KX646016	CNM-CM 7767
KX646017	CNM-CM 8013
<i>RPB1 sequences</i>	
KX646018	CNM-CM 1006
KX646019	CNM-CM 1049
KX646020	CNM-CM 1547
KX646021	CNM-CM 1711
KX646022	CNM-CM 1712
KX646023	CNM-CM 1713
KX646024	CNM-CM 2028
KX646025	CNM-CM 2075
KX646026	CNM-CM 2290
KX646027	CNM-CM 2462
KX646028	CNM-CM 2721
KX646029	CNM-CM 2854
KX646030	CNM-CM 2905
KX646031	CNM-CM 2906
KX646032	CNM-CM 2907
KX646033	CNM-CM 3036
KX646034	CNM-CM 3153
KX646035	CNM-CM 3221
KX646036	CNM-CM 3576
KX646037	ATCC 24295
KX646038	CNM-CM 4892
KX646039	CNM-CM 4921
KX646040	CNM-CM 5659

<i>RPB1 sequences</i>	
KX646041	CNM-CM 5678
KX646042	CNM-CM 5679
KX646043	CNM-CM 5692
KX646044	CNM-CM 5731
KX646045	CNM-CM 5787
KX646046	CNM-CM 5788
KX646047	CNM-CM 6015
KX646048	CNM-CM 6066
KX646049	CNM-CM 6305
KX646050	CNM-CM 6306
KX646051	CNM-CM 6307
KX646052	CNM-CM 6408
KX646053	CNM-CM 6409
KX646054	CNM-CM 6556
KX646055	CNM-CM 7001
KX646056	CNM-CM 7057
KX646057	CBS 215.53
KX646058	CBS 175.57
KX646059	CBS 287.54
KX646060	CBS 136.72
KX646061	CNM-CM 7441
KX646062	CNM-CM 7450
KX646063	CNM-CM 7514
KX646064	CNM-CM 7704
KX646065	CNM-CM 7717
KX646066	CNM-CM 7767
KX646067	CNM-CM 8013
<i>OLE sequences</i>	
KX646068	CNM-CM 1006
KX646069	CNM-CM 1049
KX646070	CNM-CM 1547
KX646071	CNM-CM 1711
KX646072	CNM-CM 1712
KX646073	CNM-CM 1713
KX646074	CNM-CM 2028
KX646075	CNM-CM 2075
KX646076	CNM-CM 2290
KX646077	CNM-CM 2462
KX646078	CNM-CM 2721
KX646079	CNM-CM 2854

KX646080	CNM-CM 2905
KX646081	CNM-CM 2906
KX646082	CNM-CM 2907
KX646083	CNM-CM 3036
KX646084	CNM-CM 3153
KX646085	CNM-CM 3221
KX646086	CNM-CM 3576
KX646087	ATCC 24295
KX646088	CNM-CM 4892
KX646089	CNM-CM 4921
KX646090	CNM-CM 5659
KX646091	CNM-CM 5678
KX646092	CNM-CM 5679
KX646093	CNM-CM 5692
KX646094	CNM-CM 5731
KX646095	CNM-CM 5787
KX646096	CNM-CM 5788
KX646097	CNM-CM 6015
KX646098	CNM-CM 6066
KX646099	CNM-CM 6305
KX646100	CNM-CM 6306
KX646101	CNM-CM 6307
KX646102	CNM-CM 6408
KX646103	CNM-CM 6409
KX646104	CNM-CM 6556
KX646105	CNM-CM 7001
KX646106	CNM-CM 7057
KX646107	CBS 215.53
KX646108	CBS 175.57
KX646109	CBS 287.54
KX646110	CBS 136.72
KX646111	CNM-CM 7441
KX646112	CNM-CM 7450
KX646113	CNM-CM 7514
KX646114	CNM-CM 7704
KX646115	CNM-CM 7717
KX646116	CNM-CM 7767
KX646117	CNM-CM 8013
<i>MAT1 sequences</i>	
KX646118	CNM-CM 1006
KX646119	CNM-CM 1049

MAT1 sequences	
KX646120	CNM-CM 1547
KX646121	CNM-CM 1711
KX646122	CNM-CM 1712
KX646123	CNM-CM 1713
KX646124	CNM-CM 2028
KX646125	CNM-CM 2075
KX646126	CNM-CM 2290
KX646127	CNM-CM 2462
KX646128	CNM-CM 2721
KX646129	CNM-CM 2854
KX646130	CNM-CM 2905
KX646131	CNM-CM 2906
KX646132	CNM-CM 2907
KX646133	CNM-CM 3036
KX646134	CNM-CM 3153
KX646135	CNM-CM 3221
KX646136	CNM-CM 3576
KX646137	ATCC 24295
KX646138	CNM-CM 4892
KX646139	CNM-CM 4921
KX646140	CNM-CM 5659
KX646141	CNM-CM 5678
KX646142	CNM-CM 5679
KX646143	CNM-CM 5692
KX646144	CNM-CM 5731
KX646145	CNM-CM 5787
KX646146	CNM-CM 5788
KX646147	CNM-CM 6015
KX646148	CNM-CM 6066
KX646149	CNM-CM 6305
KX646150	CNM-CM 6306
KX646151	CNM-CM 6307
KX646152	CNM-CM 6408
KX646153	CNM-CM 6409
KX646154	CNM-CM 6556
KX646155	CNM-CM 7001
KX646156	CNM-CM 7057
KX646157	CBS 215.53
KX646158	CBS 175.57
KX646159	CBS 287.54

KX646160	CBS 136.72
KX646161	CNM-CM-7441
KX646162	CNM-CM-7450
KX646163	CNM-CM-7514
KX646164	CNM-CM-7704
KX646165	CNM-CM-7717
KX646166	CNM-CM-7767
KX646167	CNM-CM-8013

ANEXO V: COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES DERIVADAS DEL TRABAJO DE LA TESIS

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES

1. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica . Valencia, 9-11 Abril 2014.

Formato de la presentación: Oral

Autores: Clara Valero, Sara Gago, Manuel Cuenca-Estrella, María José Buitrago.

Título: Caracterización molecular de las dos variedades de *Histoplasma capsulatum* (*var. capsulatum* y *var. duboisii*) y diferenciación mediante *High Resolution Melting* (HRM).

Introducción: La histoplasmosis es una micosis primaria causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* que es endémico del continente Americano y África. En los últimos años, debido a la inmigración y al tránsito de viajeros su incidencia en nuestro país ha aumentado considerablemente. Se han descrito dos variedades de la especie que afectan a humanos: *var. duboisii* y *var. capsulatum*. Aun cuando la primera es exclusiva del continente africano (África del este, central y Madagascar), la *var. capsulatum* aunque es endémica de América del Norte y del Sur está también presente en el continente africano. Los estudios con la variedad africana son muy escasos y, además, las técnicas moleculares basadas en las regiones ITS no permiten diferenciar entre las dos variedades. Sin embargo, la morfología en fase levadura y la manifestación clínica en el paciente de ambas variedades son distintas.

Objetivo: Caracterizar las dos variedades de *Histoplasma capsulatum* mediante un análisis por Multilocus Sequence Typing (MLST) y diseñar un método rápido de HRM para diferenciarlas.

Materiales y métodos: En el estudio se incluyeron 16 cepas de *Histoplasma capsulatum* de distinto origen geográfico pertenecientes a la colección del Servicio de Micología (CNM, ISCIII). Las cepas fueron caracterizadas mediante el desarrollo de un método de MLST que incluía el análisis mediante PCR convencional de 4 regiones del genoma (ITS, RPB, D1-D2 y OLE). Los productos obtenidos se purificaron y secuenciaron.

Las secuencias se editaron mediante el programa SeqMan (Lasergene) y los análisis filogenéticos se llevaron a cabo mediante el programa MEGA 5.2. En base a los resultados obtenidos se diseñó un experimento de HRM para amplificar un fragmento de 105 pb del gen OLE. Los cebadores fueron diseñados con el programa Molecular Beacon 4.0 (Palo Alto, CA) y el análisis de las curvas de fusión se realizó con el programa Precision Melt Analysis Software 1.1 (Bio-Rad).

Resultados: El análisis por separado de cada una de las regiones no permitió diferenciar grupos monofiléticos para ambas variedades. Sin embargo, el análisis de las secuencias concatenadas mediante MLST nos permitió aumentar la resolución y discriminar las dos variedades. A pesar de las limitaciones del análisis de los genes de forma individual, la secuencia del gen OLE permitió discriminar con la suficiente robustez todas las cepas de acuerdo a su origen geográfico, de ahí que consideráramos el gen OLE como el mejor candidato para desarrollar el análisis mediante HRM. Todas las cepas incluidas en el análisis por HRM se agruparon correctamente de acuerdo a las diferencias observadas en la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado del gen OLE.

Conclusión:

1. El análisis de MLST permite diferenciar entre las dos variedades.
2. El gen OLE es el locus más adecuado para diferenciar las dos variedades según su origen geográfico.
3. La técnica de HRM diseñada permite la diferenciación de ambas variedades de una forma rápida y sencilla.

2. XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica . Sevilla, 28-30 Mayo 2015.

Formato de la presentación: Póster

Autores: Clara Valero, María José Buitrago, Sara Gago, Inmaculada Quiles-Melero, Julio García-Rodríguez.

Título: Construcción y validación de una librería de referencia para la identificación de *Histoplasma capsulatum* mediante MALDI-ToF.

Introducción: La histoplasmosis es una micosis endémica causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. La incidencia de esta enfermedad en España ha aumentado debido al incremento de la población inmigrante y al tránsito de viajeros. El método de diagnóstico de referencia se basa en el cultivo del hongo, sin embargo, éste presenta un crecimiento lento y se requieren instalaciones BSL-3 para su manipulación. En los últimos años la tecnología MALDI-ToF se ha consolidado como una herramienta alternativa a los métodos clásicos de identificación aunque hasta la fecha no existen registros de *H. capsulatum* en las librerías de referencia comerciales más utilizadas.

Objetivo: i) Creación de una librería de referencia para la identificación de *H. capsulatum* mediante MALDI-ToF y ii) validación de dicha librería con cepas de la colección del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología.

Material y métodos: Para crear la librería se utilizaron 6 cepas clínicas de la colección del Servicio de Micología, 3 de ellas en ambas fases morfológicas. Se dejaron crecer durante 3 semanas y se realizó el proceso de extracción proteica recomendado por el fabricante (Bruker, Alemania). De cada cepa se realizaron ocho réplicas que se sometieron al análisis MALDI-ToF por triplicado. La librería se configuró con aquellos espectros de mayor calidad. Para la validación se seleccionaron 89 cepas, 53 cepas de *H. capsulatum* y 35 pertenecientes a otras especies fúngicas. Se realizó un ensayo en ciego donde dos réplicas de cada cepa que había crecido durante 7 días, previa extracción proteica, se sometieron al análisis MALDI-ToF. Los espectros obtenidos se enfrentaron a la librería de *H. capsulatum* combinada con otras librerías comerciales abarcando así toda clase de microorganismos. Se consideró un resultado válido si de las 2 determinaciones de cada cepa al menos una de ellas coincidía con un valor ≥ 1.7 .

Resultados: El 77% de las cepas “no-*H. capsulatum*” se identificaron correctamente con valores de score entre 1.42 y 2.389. Entre las cepas restantes (n=8, 23%), 4 no estaban representadas en las bases de datos, de 1 no se consiguió obtener el espectro proteico y tan solo 3 no fueron identificadas por el equipo. De las cepas de *H. capsulatum*, el 63% fueron identificadas con un score ≥ 1.7 , lo que correspondió al 70.6% de las cepas en fase micelial y al 50% de las cepas en fase levaduriforme. Estableciendo como resultado válido un valor de score ≥ 1.6 , el grado de acierto aumentó a un 89% que implicaba el 94% de las cepas miceliales y el 80% de las cepas levaduriformes.

Conclusiones:

i) La librería de *H. capsulatum* creada proporcionó una identificación específica del 89% de las cepas de *H. capsulatum* cuando el score se bajó a ≥ 1.6 .

ii) La librería permitió la identificación de las cepas de *H. capsulatum* en ambas fases morfológicas con una eficiencia similar.

ii) La tecnología MALDI-ToF permite la identificación de *H. capsulatum* de una forma rápida y sencilla a partir de la forma levaduriforme, menos peligrosa, o de un cultivo en su fase inicial de crecimiento, adelantando así el tiempo de respuesta.

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

1. 7th Trends in Medical Mycology (TIMM). 9-12 Octubre, Lisboa.

Formato de la presentación: Póster

Autores: Clara Valero, María José Buitrago, Sara Gago, Inmaculada Quiles-Melero, Julio García-Rodríguez.

Título: Development of a reference database for the identification of *Histoplasma capsulatum* by MALDI-ToF Mass Spectrometry.

Objectives: The diagnosis of histoplasmosis is based on the isolation of the fungus in cultures. However, it is time-consuming and biosafety level 3 containment is needed. MALDI-ToF technology has been established as a suitable tool for microbial identification although there are no entries of *H. capsulatum* spectra in most used commercial MALDI databases. The main objectives of this work are: i) construction of a reference database for the identification of *Histoplasma capsulatum* by MALDI-ToF technology and ii) validation of this database with isolates belonging to the Collection of the Spanish National Centre for Microbiology.

Methods: A reference database was created using high quality spectra from six strains of *H. capsulatum* previously identified by molecular methods. Three strains were included in both morphological states (mycelia and yeast) and also the three varieties recognized for the fungus (*var. capsulatum*, *var. duboisii* and *var. farciminosum*) and the type strain were represented. To construct the database, the fungal isolates were grown for three weeks and subjected to protein extraction following the method recommended by the manufacturer (Bruker Daltonics, Germany). Each sample was assessed eight times and MS-measurement was performed in triplicate. For validating the new database, 89 fungal isolates were selected from the Collection of the Spanish National Centre for Microbiology: 35 strains belonging to different fungal species and a total of 54 strains of *H. capsulatum*. Protein extraction was performed after seven days of culture and all protein extracts were analysed in duplicate against the MS new reference database created plus other commercial and in-house MALDI databases.

Results: Globally, 81 strains were correctly identified with variable scores ranging from 1.42 to 2.4 and 66 of them (81.5 %) had a score above manufacturer cut-off for reliability at genus level (score ≥ 1.7). All *H. capsulatum* isolates were properly identified with scores ranging from 1.46 to 2.2. The reliability score ≥ 1.7 was reached by 41 of them (76 %), 30 in mycelial state (86 % of the total of *H. capsulatum* strains in mycelial state) and 11 in yeast form (58 % of the total of *H. capsulatum* strains in yeast state). However, when this cut-off was lowered to score ≥ 1.6 , the number of strains properly identified rose to 49 (91 %), including 33 mycelial forms (94 % of mycelial-form isolates) and 16 yeast forms (84 % of yeast-form isolates).

Conclusions:

- i) The database created provided a suitable identification for 76 % of *H. capsulatum* isolates when the cut-off score was set at 1.7 and 91 % when this cut-off was 1.6.
- ii) The database created was able to identify both morphological phases of the fungus and the three varieties.
- iii) MALDI-ToF technology yields a prompt and simple identification from *H. capsulatum* yeast forms or early mycelial cultures. It allows for reducing the time of response and decreasing the risk in manipulating the fungus.

2. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). 9-12 Abril, Amsterdam.

Formato de la presentación: Oral

Autores: Clara Valero, Laura de la Cruz-Villar, María José Buitrago.

Título: A New Panfungal PCR Assay for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections.

Background: Invasive fungal infections (IFIs) diagnosis remains difficult. Classical diagnostic methods have many limitations such as late diagnosis, low sensitivity and the impossibility of differentiating the species. As a consequence of that, frequently, there is a delay in the initiation of appropriate antifungal therapy with a fatal outcome for the patients. In recent years, molecular methods have emerged as a suitable alternative to conventional methods for the diagnosis of IFIs. When there is not a clear suspicion about the fungus involved in the IFI, panfungal real time PCR assays have been used, allowing amplification of any fungal species DNA. However, this approach requires subsequent amplicon sequencing to identify species, increasing response time. In this work, a new panfungal real time PCR, which is able to detect the presence of fungal DNA in clinical samples and to identify the species involved in the infection and avoiding sequencing in most of the cases, has been standardised and validated.

Material/methods: A panfungal PCR assay was developed using the combination of an intercalating dye and five sequence-specific molecular beacon probes. Primers were designed to amplify the ITS1 region of fungal rDNA and molecular beacon probes labelled with different fluorescent dyes were designed to detect different groups of fungi: i) *Aspergillus* sp., ii) *Rhizopus* sp., iii) *Mucor* sp., iv) endemic dimorphic fungi. Genomic DNA from forty different fungal species belonging to the collection of the Spanish National Centre for Microbiology was used for the standardization of the technique. Furthermore, a specificity test was also performed to verify the absence of cross-reaction between probes. The panfungal PCR assay was tested in 60 clinical samples from patients with proven IFI. A melting curve analysis was also performed. The range of melting temperatures (T_m) values was established for each fungal species based on the results obtained in standardization assays.

Results: The technique developed had a high reproducibility and showed a low coefficient of variation (<5 %). Detection limits were between 100 to 1fg of genomic fungal DNA per microliter of sample. Furthermore, the assay showed a great specificity since no cross-reaction was detected, with the exception of *Penicillium commune* that was detected by *Aspergillus* sp. probe. A melting curve database was constructed in order to be used for species identification. Forty-six out of the sixty clinical samples tested gave a positive result and the sensitivity of the assay was 76%.

Conclusions:

i) This panfungal PCR assay is fast, sensitive and specific for the detection of any fungal species in clinical samples and, in many instances, avoiding amplicon sequencing.

ii) This technique could improve the diagnosis of IFIs when there are no conclusive data about the fungus involved in the disease.

