

El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos

José Pontón

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

Resumen

La utilidad de los marcadores serológicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora pasa por detectar la infección por las distintas especies del género *Candida* y diferenciar cuando estos hongos se encuentran como colonizadores y cuando se encuentran causando una infección invasora. Esta diferenciación se ha intentado detectando antígenos, anticuerpos y otros componentes de *Candida* en el suero de los pacientes. En este artículo se revisan los antígenos, anticuerpos y otros componentes de *Candida* que son de utilidad en el diagnóstico de laboratorio de la candidiasis invasora en pacientes críticos no neutropénicos.

Palabras clave

Candidiasis invasora, UCI, Diagnóstico, Antígenos, Métodos independientes del cultivo, Anticuerpos, (1→3)-β-D-glucano

Microbiological non-culture methods for the diagnosis of invasive candidiasis: usefulness of surrogate markers

Summary

The usefulness of surrogate markers in the diagnosis of invasive candidiasis is based on their ability to detect the infection caused by the different *Candida* spp. and to differentiate when the fungus is a colonizer or it is causing an invasive disease. This differentiation has been tried by detecting antigens, antibodies and other *Candida* components in the patient's sera. In this paper we will review the antigens, antibodies and other *Candida* components which may be useful in the laboratory diagnosis of invasive candidiasis in the non-neutropenic critically ill patient.

Key words

Invasive candidiasis, ICU, Diagnosis, Non-culture-methods, Antigens, Antibodies, (1→3)-β-D-glucano

En el diagnóstico microbiológico de la candidiasis invasora (CI) utilizando métodos independientes del cultivo se han utilizado un gran número de marcadores aprovechando la complejidad de la composición antigénica de *Candida albicans*. Estos componentes forman parte de las distintas estructuras del hongo, pero se encuentran básica-

mente en dos localizaciones: el citoplasma y la pared celular (Figura 1). Aunque los extractos citoplásmicos contienen un gran número de antígenos, los más importantes para el diagnóstico serológico de la CI son la enolasa y un antígeno de 47 kDa, que es un fragmento de una proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP 90) [20,47].

La pared celular es la estructura más externa de *C. albicans* y contiene un gran número de antígenos capaces de estimular potentes respuestas inmunológicas [37]. Entre todos los antígenos de la pared celular debemos resaltar, por su interés diagnóstico, el manano, un polisacárido muy abundante en las levaduras y los micelios de *C. albicans* y un antígeno de alto peso molecular (>260 kDa) que es específico del micelio [33]. La estructura del manano es compleja y está constituida por unidades de manosa que forman cadenas centrales largas unidas entre sí por enlaces α-1→6 y cadenas laterales cortas de unidades de manosa unidas entre sí por enlaces β-1→2 y α-1→2. Por último, los componentes no antigénicos que se liberan durante la infección y que pueden ser de utilidad diagnóstica incluyen el D-arabinitol, el β-1→3 glucano y el ADN (Figura 1).

Dirección para correspondencia:

Dr. José Pontón
Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco
Apdo. 699
48080 Bilbao, España
Tel.: +34 94 601 2855
Fax: +34 94 601 3400
E-mail: jose.ponton@ehu.es

©2006 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 Euros

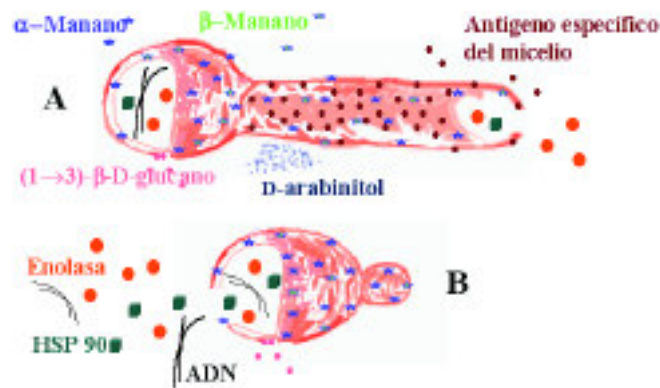


Figura 1. Principales componentes del micelio (A) y la levadura (B) de *C. albicans* de utilidad en el diagnóstico serológico de la candidiasis invasora. Adaptado de Pontón [32].

La utilidad de los marcadores serológicos en el diagnóstico de la CI pasa por detectar la infección por las distintas especies del género *Candida* y diferenciar cuando estos hongos se encuentran como colonizadores y cuando se encuentran causando una infección invasora. Esta diferenciación se ha intentado detectando antígenos, anticuerpos y otros componentes de *Candida* en el suero de los pacientes.

Detección de antígeno en el paciente crítico con CI

Desde el año 1976, en el que se publicó el primer trabajo sobre la detección de antígeno en pacientes con candidiasis invasora, se han producido avances importantes en este campo. En general, se han desarrollado técnicas más sensibles y se ha pasado de la detección conjunta de varios antígenos a la detección de antígenos circulantes específicos e incluso epitopos específicos de esos antígenos. Sin embargo, no existe todavía una técnica aceptada universalmente [32].

El primero de los antígenos detectados en el diagnóstico serológico de la candidiasis invasora fue el manano. Este antígeno presenta una serie de características que deben de tenerse en cuenta en los estudios serológicos. En primer lugar, es un polisacárido que se encuentra en la pared celular de la mayoría de las especies del género *Candida* de importancia médica, aunque la capacidad de

detección de este antígeno en diferentes especies es variable debido a su diferente contenido en manano. Además, aunque normalmente se encuentra formando complejos con los anticuerpos anti-manano presentes en el suero de la mayoría de las personas, su naturaleza polisacárida permite la disociación de estos complejos utilizando enzimas proteolíticas o calentamientos que destruyen los anticuerpos y dejan libre el manano para ser detectado. Por último, el manano es eliminado rápidamente de la circulación, por lo que se hace necesario el estudio de muestras seriadas de un mismo paciente para aumentar sus posibilidades de detección.

Los estudios iniciales realizados con pruebas experimentales desarrolladas en laboratorios de investigación demostraron que la detección de manano en pacientes con CI permitieron un diagnóstico específico pero poco sensible, debido a la corta duración de la mananemia. La mayoría de los trabajos se han realizado en pacientes neutropénicos con enfermedades hematológicas o en grupos mixtos que incluyen pacientes hematológicos y pacientes quirúrgicos, pero en esta revisión nos centraremos en pacientes críticos no neutropénicos (Tabla 1). Recientemente se ha publicado que la detección de manano en LCR puede ser útil en el diagnóstico de la meningitis por *Candida* [52].

A pesar de los diferentes antígenos estudiados, la detección de antígeno en pacientes con CI no ha permitido solucionar el problema diagnóstico que presenta esta

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de las pruebas que detectan antígeno en pacientes no neutropénicos con CI.

| Prueba | Antígeno | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | Tipo de estudio | Referencia |
|-------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------------|
| Pastorex <i>Candida</i> | Manano | 52,6 | 100,0 | R | Herent et al. [15] |
| Pastorex <i>Candida</i> | Manano | 0,0 | 0,0 | R | Gutiérrez et al. [11] |
| Pastorex <i>Candida</i> | Manano | 65,6 | 88,9 | R | Pontón [31] |
| Pastorex <i>Candida</i> | Manano | 25,6 | 100,0 | R | Mitsutake et al. [22] |
| No comercializada | Manano β -1 \rightarrow 2 | 35,0 | 100,0 | R | Poulain et al. [38] |
| No comercializada | Manano α -1 \rightarrow 2 | 35,0 | 100,0 | R | Poulain et al. [38] |
| No comercializada | Manano y otros | 96,7 | 98,8 | R | Burnie [4] |
| No comercializada | HSP90 | 87,5 | 92,8 | R | Matthews y Burnie [19] |
| Candigen | Enolasa | 13,0 | 100,0 | R | Elsayed et al. [7] |
| No comercializada | Enolasa | 71,8 | 100,0 | R | Mitsutake et al. [22] |

R: retrospectivo

micosis y no existe una prueba aceptada universalmente. La detección de manano parece ser más sensible y específica que el Cand-Tec [1,17,25]. La comercialización de pruebas para la detección de antígenos de *Candida* debería de haber facilitado el diagnóstico serológico de la CI al disponerse de pruebas estandarizadas. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento son poco esperanzadores, al haberse retirado del mercado varias pruebas, y las que quedan, han presentado bastante variabilidad en las evaluaciones realizadas. Dado que la antigenemia en los pacientes con CI es transitoria, es posible que se necesite la combinación de técnicas que detecten diferentes antígenos o epitopos para aumentar la sensibilidad diagnóstica, como se ha demostrado en varios estudios [16,22,35,38].

Detección de anticuerpos en el paciente crítico con CI

A pesar de la larga experiencia acumulada en este campo, en los últimos años se ha cuestionado la utilidad de la detección de anticuerpos anti-*Candida* en pacientes con CI debido a que puede presentar dos limitaciones importantes: 1) la detección de títulos altos de anticuerpos en pacientes que están solamente colonizados por *Candida* y 2) la respuesta de anticuerpos puede estar retrasada, reducida o no existir en pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, estos problemas podrían resolverse eligiendo los antígenos apropiados y utilizando técnicas lo suficientemente sensibles para detectar títulos bajos de anticuerpos.

Los primeros antígenos utilizados en la detección de anticuerpos en pacientes con CI utilizaban células completas de *Candida* o extractos antigénicos muy complejos que siempre incluían mananos. En estos trabajos se detectaban fundamentalmente anticuerpos anti-manano que estaban presentes en pacientes con CI, pero también en pacientes sin infección por *Candida*, e incluso en individuos sanos, lo que reducía de forma muy importante la especificidad de las pruebas [31]. Sin embargo, pese a la baja especificidad que presenta la detección de anticuerpos anti-manano, estos anticuerpos pueden tener utilidad en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con CI, si se estudia la evolución de los títulos de anticuerpos en muestras seriadas de un mismo paciente. La detección seriada de estos anticuerpos también es de utilidad en el seguimiento de pacientes inmunocomprometidos con CI [51].

Los intentos para solucionar el problema de la baja especificidad observada en la detección de anticuerpos anti-manano incluyeron la detección de anticuerpos frente a antígenos del citoplasma o específicos de la fase filamentosa de *C. albicans*. En el caso de los antígenos citoplásmicos, la eliminación del manano de los extractos

antigénicos y la identificación de antígenos inmunodominantes que no contienen manano ha abierto nuevas perspectivas en el diagnóstico serológico de la CI (Tabla 2) [16,35].

El aumento de la especificidad del diagnóstico serológico de la CI también se ha intentado utilizando antígenos de la fase micelial de *C. albicans*, ya que la fase micelial facilita la penetración del hongo en los tejidos y por tanto, los anticuerpos contra los antígenos de esta fase morfológica podrían ser un marcador de la invasión tisular. Nuestro grupo ha estudiado la utilidad de la detección de los anticuerpos anti-micelio para identificar los pacientes con CI (Figura 2) [36,39-42]. Utilizando una técnica de inmunofluorescencia indirecta con el suero adsorbido para eliminar los anticuerpos antimicelio, Quindós et al. [39,41] obtuvieron una sensibilidad del 77-89% y una especificidad del 91-100% en el diagnóstico de la CI en varios grupos de pacientes, incluyendo pacientes inmunocomprometidos (Tabla 2).

En un estudio prospectivo realizado en pacientes ingresados en una Unidad de Cuidados Intensivos, se ha observado que la detección de anticuerpos anti-micelio se correlaciona bien con los datos microbiológicos y clínicos de los pacientes con CI y que puede ser utilizada en el diagnóstico y seguimiento de la candidiasis invasora en la UCI, ya que estos anticuerpos se detectan antes que exista una evidencia microbiológica de la infección y su título disminuye cuando el tratamiento antifúngico tiene éxito [16]. La utilización de los antígenos purificados específicos de la fase micelial de *C. albicans* puede ser la base del desarrollo de nuevas pruebas serológicas. Laín et al. [18] han utilizado el antígeno recombinante Hwp1 de la pared celular de *C. albicans* en un ELISA para detectar la presencia de anticuerpos en pacientes con CI. En este estudio se obtuvo una sensibilidad del 88,9%, y una especificidad del 82,6% en el diagnóstico de la CI, sin tener que adsorber el suero para eliminar los anticuerpos anti-manano.

Detección de otros marcadores en el paciente crítico con CI

En los últimos años se están realizando avances importantes en la detección de marcadores séricos de la CI diferentes de los antígenos y anticuerpos. Entre ellos debemos destacar el D-arabinitol y el (1→3)-β-D-glucano.

El D-arabinitol es un metabolito producido por *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida kefyr* que puede detectarse utilizando cromatografía de gas-líquido en el suero y orina de pacientes con CI, aunque requiere técnicas complejas que hacen su detección poco práctica (Tabla 3).

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de las pruebas que detectan anticuerpos en pacientes no neutropénicos con CI.

| Prueba | Antígeno | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | Tipo de estudio | Referencia |
|---------------------------------|--------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------------------|
| No comercializada | Citoplásmico | 70,0 | 85,7 | R | Van Deventer et al. [50] |
| No comercializada | HSP90 | 92,0 | 62,0 | R | Matthews et al. [20] |
| No comercializada | Enolasa | 50,0 | 86,0 | R | Van Deventer et al. [50] |
| No comercializada | Enolasa | 92,5 | 95,0 | R | Mitsutake et al. [21] |
| Syscan3 | Enolasa | 74,0 | 75,0 | R | Philip et al. [29] |
| No comercializada | Micelio | 77-89 | 91-100 | R | Quindós et al. [39,41] |
| No comercializada | Micelio | 75,0 | 100 | R | Torres-Rodríguez et al. [49] |
| <i>Candida albicans</i> IFA IgG | Micelio | 84,4 | 94,7 | P/R | Moragues et al. [24] |
| No comercializada | Micelio | 78,0 | 82,0 | R | Berdin et al. [2] |

R: retrospectivo, P/R: sueros obtenidos prospectivamente, pero estudiados retrospectivamente

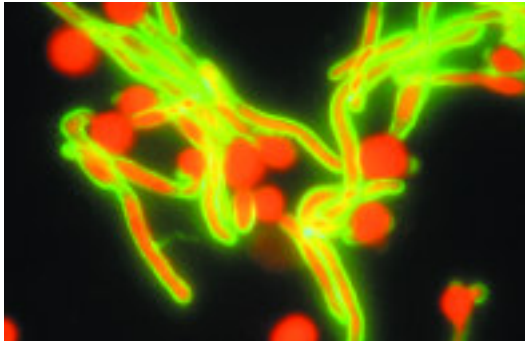


Figura 2. Anticuerpos anti-micelio de *C. albicans*. Adaptado de Pontón y cols. [34].

Puesto que se han detectado niveles elevados de D-arabinitol en pacientes con fallo renal y el D-arabinitol se aclara por los riñones al mismo ritmo que la creatinina, la proporción arabinitol/creatinina corrige las variaciones en el suero de D-arabinitol debidas a la función renal. Es posible diferenciar el arabinitol producido por *Candida* del arabinitol generalmente encontrado en humanos, ya que *Candida* produce solamente D-arabinitol, mientras que los humanos producen sólo L-arabinitol, por lo que la proporción D-arabinitol/L-arabinitol es útil para diferenciar pacientes con CI de los que tienen fallo renal [43]. La proporción D-arabinitol/L-arabinitol en orina puede ser un marcador temprano de la CI.

Además del manano, el glucano es un componente importante de la pared celular que se libera durante la infección y puede detectarse (1→3)-β-D-glucano en el plasma. Aunque no es específico de la CI, puede utilizarse en el diagnóstico de varias micosis, incluida la CI. El ser humano carece de glucanasas para digerir el (1→3)-β-D-glucano y por tanto, la eliminación de este metabolito es lenta [13]. La evaluación preliminar de la técnica ha mostrado una sensibilidad mayor que el 78% y una especificidad mayor del 87,5% en el diagnóstico de la candidemia (Tabla 3) y Odabasi et al. [27] han observado que el (1→3)-β-D-glucano se positiviza una media de diez días antes que el diagnóstico clínico. Se han detectado resultados falsos-positivos en pacientes en tratamiento con hemodiálisis con aparatos que tengan membranas de celulosa, así como aquellos tratados con albúmina o productos de globulinas, agentes anti-cancerosos (lentinan, crestin y sizofuran) y ciertos antibióticos [13]. Sin embargo, Digby et al. [6] no han encontrado útil la detección de (1→3)-β-D-glucano para diferenciar la infección fúngica invasora de la infección bacteriana en pacientes críticos. Este estu-

dio, aunque se realizó prospectivamente, solamente analizó una muestra de cada paciente, lo que puede haber disminuido notablemente la sensibilidad de la prueba y algunos de los subgrupos de pacientes eran demasiado pequeños para obtener conclusiones significativas. La detección de (1→3)-β-D-glucano se ha utilizado también para seleccionar pacientes quirúrgicos con colonización por *Candida* que podrían beneficiarse de un tratamiento antifúngico empírico, ya que el 47% de los pacientes que tenían (1→3)-β-D-glucano respondieron al tratamiento empírico con fluconazol [48].

Combinación de pruebas

En general, las combinaciones de varias pruebas pueden ser útiles para superar las deficiencias de cada prueba individual. Se han intentado combinaciones de pruebas que incluyen la detección de anticuerpos y antígenos [9,12,44,46], antígenos y componentes no antigénicos [5,13,22] y anticuerpos, antígenos y componentes no antigénicos [3,30]. Las combinaciones tan diversas de pruebas utilizadas en cada estudio individual hace las comparaciones entre estudios difícil, pero las combinaciones de pruebas que detectan anticuerpos y antígenos han mostrado que puede mejorarse el diagnóstico de la CI [9,44,46].

La utilización de anticuerpos monoclonales que reconocen epitopos específicos de los antígenos puede mejorar el diagnóstico serológico de la CI. Empleando dos anticuerpos monoclonales, uno que reconoce epitopos oligomanosídicos con enlaces β-1→2 y otro con enlaces α-1→2, se ha observado una baja sensibilidad individual del 35%, pero la detección de los dos antígenos permitió una sensibilidad del 50% [38] (Tabla 1). La detección de estos antígenos en algunos pacientes fue posible antes de que existiese una evidencia microbiológica de la candidiasis, demostrándose la transitoriedad de la mananemia en los pacientes con CI y que la antigenemia puede ser negativa para un antígeno que posea un epitopo oligomanosídico pero positiva para otro que presente una especificidad diferente, pudiendo estos antígenos presentar cinéticas diferentes y complementarias en un mismo paciente. La detección conjunta de los dos antígenos en un mismo paciente podría aumentar la sensibilidad diagnóstica al compensar la transitoriedad de la antigenemia de cada uno de los epitopos del manano. Básicamente, estos resultados se han confirmado en un estudio posterior [45].

La necesidad de una combinación de pruebas es evidente cuando un antígeno específico y anticuerpos contra este antígeno se detectan en el mismo paciente, ya que los anticuerpos pueden facilitar el aclaramiento de los

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de las pruebas que detectan componentes no antigénicos en pacientes no neutropénicos con CI.

| Prueba | Antígeno | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | Tipo de estudio | Referencia |
|-------------------|-------------------------|------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|
| No comercializada | D-arabinitol | 56,3 | 60,0 | R | Eng et al. [8] |
| No comercializada | D-arabinitol | 45,5 | 76,2 | NA | Bougnoux et al. [3] |
| No comercializada | D/L-arabinitol | 83,3 | 100,0 | R | Roboz et al. [43] |
| No comercializada | D-arabinitol/Creatinina | 50,0 | 91,0 | R | Fujita et al. [10] |
| FungiTec G | β-1,3-D-glucano | 78,0 | 95,5 | R | Kohno et al. [14] |
| FungiTec G | β-1,3-D-glucano | 100,0 | 100,0 | R | Miyazaki et al. [23] |
| FungiTec G | β-1,3-D-glucano | 90,0 | 100,0 | R | Obayashi et al. [26] |
| FungiTec G | β-1,3-D-glucano | 84,4 | 87,5 | P | Chryssanthou et al. [5] |
| FungiTec G | β-1,3-D-glucano | 50,0 | 58,3 | R | Mitsutake et al. [22] |
| Fungitell | β-1,3-D-glucano | 60-100 | 90-99 | P | Odabasi et al. [27] |
| Fungitell | β-1,3-D-glucano | 81,3 | 87,1 | R | Ostrosky-Zeichner et al. [28] |

R: retrospectivo, P: prospectivo; NA: no aplicable

antígenos. La detección de manano y anticuerpos anti-manano se complementa en pacientes con CI. El diagnóstico de la candidemia se mejora cuando se utilizan varias combinaciones de tests incluyendo la detección de manano y anticuerpos anti-manano [44,46], (1→3)-β-D-glucano y manano [22,14] y enolasa y (1→3)-β-D-glucano [22]. Platenkamp et al. [30] comunicaron una sensibilidad del 77% y una especificidad del 100 al combinar la detección de un anticuerpo, un antígeno y D-arabinitol para diferenciar la CI de la colonización por *Candida* en pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, Bougnoux et al. [3] no encontraron útil la combinación de un anticuerpo, antígeno y D-arabinitol para diferenciar la CI de la candidiasis superficial.

Conclusiones

El diagnóstico de la CI utilizando métodos independientes del cultivo puede ser de utilidad en el paciente crítico febril que presenta hemocultivos negativos y factores de riesgo para desarrollar esta infección fúngica, así como para el seguimiento de la respuesta al tratamiento. Hasta el momento, los métodos desarrollados para el diagnóstico serológico no han alcanzado una distribución generalizada por su baja sensibilidad en muestras únicas y el lento desarrollo de nuevas pruebas comercializadas. Sin embargo, el diagnóstico de la CI podría beneficiarse del desarrollo de nuevas pruebas comercializadas, basadas en la detección de antígenos y anticuerpos de *Candida*. Entre los antígenos potencialmente interesantes se encuentran la enolasa y algunos epitopos del manano y entre los anticuerpos deben destacarse aquellos dirigidos contra antígenos de la fase micelial [16].

A diferencia de lo que ocurre en el diagnóstico serológico de la meningoencefalitis criptocócica, para el que existe una prueba de aglutinación de partículas de látex que permite detectar el polisacárido capsular de

Cryptococcus neoformans con una gran sensibilidad y especificidad, la evidencia experimental acumulada hasta el momento sugiere que el diagnóstico serológico de la CI no se logrará con la utilización de una única prueba que detecte un antígeno o un anticuerpo. Por el contrario, dada la complementariedad observada en algunos estudios, es probable que sea necesaria la detección de varios marcadores para lograr niveles de sensibilidad óptimos.

Dado que el diagnóstico basado en una única muestra carece de sensibilidad, es necesario el estudio de muestras seriadas tomadas cuando el paciente presenta el máximo riesgo de desarrollar una CI para optimizar el diagnóstico. La primera muestra debería tomarse al momento de la admisión del paciente para disponer de datos basales. Además, es posible que los pacientes deban ser estudiados teniendo en cuenta las diferentes cinéticas de cada marcador (semanalmente para anticuerpos y al menos dos veces por semana para (1→3)-β-D-glucano, antígeno y D-arabinitol).

Mientras se determinan cuales son los antígenos y anticuerpos que deben detectarse en el futuro, el diagnóstico serológico actual debería basarse en la utilización de pruebas comercializadas para estudiar muestras seriadas de un paciente que permitan analizar la evolución de los títulos de antígeno, anticuerpo y de (1→3)-β-D-glucano y su correlación con los datos clínicos y microbiológicos del paciente.

La investigación realizada en el laboratorio del autor ha sido financiada en parte con fondos del Fondo de Investigación Sanitaria (PI040556) y Universidad del País Vasco (9/UPV 0093.327-13550/2001).

Bibliografía

- Bailey JW, Sada E, Brass C, Bennett JE. Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum antigen. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 749-752.
- Berdin B, Boux de Casson-Raimbeau F, Marot Leblond A, Robert R, Senet JM. Etude préliminaire évaluant l'intérêt de l'utilisation d'antigène purifié (Ag3D9, Ag48) pour le sérodiagnostic des candidoses profondes par méthode immunoenzymatique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). *J Mycol Méd* 1995; 5: 140-144.
- Bougnoux M-E, Hill C, Moissenet D, de Chauvin MF, Bonnay M, Vicens-Sprael I, Pietri F, McNeil M, Kaufman L, Dupouy-Camet J, Bohuon C, Andremont A. Comparison of antibody, antigen, and metabolite assays for hospitalized patients with disseminated or peripheral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 905-909.
- Burnie J. A reverse passive latex agglutination test for the diagnosis of systemic candidosis. *J Immunol Methods* 1985; 82: 267-280.
- Chryssanthou E, Klingspor L, Tollemar J, Petrini B, Larsson L, Christensson B, Ringden O. PCR and other non-culture methods for diagnosis of invasive *Candida*-infections in allogeneic bone marrow and solid organ transplant recipients. *Mycoses* 1999; 42: 239-247.
- Digby J, Kalbfleisch J, Glenn A, Larsen A, Browder W, Williams D. Serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care unit patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 882-885.
- Elsayed S, Fitzgerald V, Massey V, Hussain Z. Evaluation of the Candigen enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of *Candida* species antigen. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 344-346.
- Eng RHK, Chmel H, Buse M. Serum levels of arabinitol in the detection of invasive candidiasis in animals and humans. *J Infect Dis* 1981; 143: 677-683.
- Fisher JF, Trinchler RC, Agel JF, Buxton TB, Walker CA, Johnson DH, Cormier RE, Chew WH, Rissing JP. Disseminated candidiasis: A comparison of two immunologic techniques in the diagnosis. *Am J Med Sci* 1985; 290: 135-142.
- Fujita S-I, Hashimoto T. Detection of serum *Candida* antigens by enzyme-linked immunosorbent assay and a latex agglutination test with anti-*Candida albicans* and anti-*Candida krusei* antibodies. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3132-3137.
- Gutierrez J, Maroto C, Piédrola G, Martín E, Perez JA. Circulating *Candida* antigens and antibodies: useful markers of candidemia. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2550-2552.
- Klingspor L, Stintzing G, Fasth A, Tollemar J. Deep *Candida* infection in children receiving allogeneic bone marrow transplants: incidence, risk factors and diagnosis. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 1043-1049.
- Kohn S. Serological diagnosis of deep-seated mycoses. *Asian Med J* 1991; 34: 460-466.
- Kohn S, Mitsutake K, Maesaki S, Yasuoka A, Miyazaki T, Kaku M, Koga H, Hara K. An evaluation of serodiagnostic

- tests in patients with candidemia: beta-glucan, mannan, *Candida* antigen by Cand-Tec and D-arabinitol. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 207-212.
15. Herent P, Stynen D, Hernando F, Fruit J, Poulain D. Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigen during invasive candidosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2158-2164.
 16. Iruretagoyena JR, Regúlez P, Quindós G, Pontón J. Antibodies to *Candida albicans* germ tubes in two intensive care patients with invasive candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 93-96.
 17. Kahn FW, Jones JM. Latex agglutination tests for the detection of *Candida* antigens in sera of patients with invasive candidiasis. *J Infect Dis* 1986; 153: 579-585.
 18. Laín A, Elguezabal N, Brena S, García-Ruiz JC, Amutio E, Moragues MD, Pontón J. Utilidad de la proteína recombinante Hwp1 de *Candida albicans* en el diagnóstico serológico de la candidiasis invasora. VI Congreso Nacional de Micología, Salamanca, 10-13 Julio de 2004.
 19. Matthews RC, Burnie JP. Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-Kd antigen. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 459-463.
 20. Matthews RC, Burnie JP, Tabaqchali S. Isolation of immunodominant antigens from the sera of patients with systemic candidiasis and characterization of the serological response to *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 230-237.
 21. Mitsutake K, Kohno S, Miyazaki T, Miyazaki H, Maesaki S, Koga H. Detection of *Candida* enolase antibody in patients with candidiasis. *J Clin Lab Anal* 1994; 8: 207-210.
 22. Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, Yamamoto Y, Kakeya H, Otsubo T, Kawamura S, Hossain MA, Noda T, Hirakata Y, Kohno S. Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and β -glucan in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1918-1921.
 23. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N, Hara K. Plasma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3115-3118.
 24. Moragues MD, Ortíz N, Iruretagoyena JR, García Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, Mendoza J, Quindós G, Pontón J. Evaluación de una nueva técnica comercializada (*Candida albicans* IFA IgG) para el diagnóstico de la candidiasis invasiva. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2004; 22: 83-88.
 25. Nakamura A, Ishikawa N, Suzuki H. Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-biotin enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2363-2367.
 26. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, Teshima H, Kohno S, Horiuchi A, Ito A, Yamaguchi H, Shimada K, Kawai T. Plasma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995; 345: 17-20.
 27. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. β -D-glucan assay as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 199-205.
 28. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, Ketchum PA, Wingard J, Schiff R, Tamura H, Finkelman MA, Rex JH. Multicenter clinical evaluation of the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 654-659.
 29. Philip A, Odabasi Z, Mattiuzzi G, Paetznick Victor L, Tan SW, Warrington, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Syscan3, a kit for detection of anti-*Candida* antibodies for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4834-4835.
 30. Platenkamp G-J, van Duin AM, Porsius JC, Schouten HJA, Zondervan PE, Michel M.F. Diagnosis of invasive candidiasis in patients with and without signs of immune deficiency: a comparison of six detection methods in human serum. *J Clin Pathol* 1987; 40: 1162-1167.
 31. Pontón J. Serología de la candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 1993; 10 (Supl. 2): 68-70.
 32. Pontón J. Valor diagnóstico de la detección de antígenos y anticuerpos frente a *Candida* spp. *Medicina Intensiva* 1999; 23: 38-46.
 33. Pontón J, Jones JM. Identification of two germ tube specific cell wall antigens of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1986; 54: 864-868.
 34. Pontón J, García ME, López Medrano R. Diagnóstico basado en métodos independientes del cultivo. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2001: 14.1-14.21.
 35. Pontón J, Moragues MD, Quindós G. Non-culture based diagnostics. En: Calderone R (Ed.) *Candida* and candidiasis. Washington, American Society for Microbiology, 2001: 395-425.
 36. Pontón J, Quindós G, Arilla MC, Mackenzie DWR. Simplified adsorption method for detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 217-219.
 37. Pontón J, Marot-Leblond A, Ezkurra PA, Barturen B, Robert R, Senet JM. Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1993; 61: 4842-4847.
 38. Poulain D, Robert R, Mesnard F, Sendid B, Lepage G, Camus D. Clearances of *Candida albicans* derived alpha and beta linked mannose residues in sera from patients with candidosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 16-20.
 39. Quindós G, Pontón J, Cisterna R. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tube in the diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6: 142-145.
 40. Quindós G, Moragues MD, Pontón J. Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis? *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 10-14.
 41. Quindós G, Pontón J, Cisterna R, Mackenzie DWR. Value of detection of antibodies to *Candida albicans* germ tube in the diagnosis of systemic candidosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 178-183.
 42. Regúlez P, Arilla MC, García Ruiz JC, Moragues MD, Quindós G, Pontón J. Estudio comparativo de dos técnicas para el diagnóstico serológico de la candidiasis invasiva. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1995; 13: 229-235.
 43. Roboz J, Nieves E, Holland JF. Separation and quantification by gas chromatography-mass spectrometry of arabinitol enantiomers to aid the differential diagnosis of disseminated candidiasis. *J Chromatogr* 1990; 500: 413-426.
 44. Sendid B, Tabouret M, Poirat JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1510-1517.
 45. Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M, Poulain D. Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of α - and β -linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 164-171.
 46. Smith KK, Qadri SMH. Rapid diagnosis of systemic candidiasis using commercial antigen and/or antibody detection kits. *J Microbiol Methods* 1992; 16: 231-237.
 47. Strockbine NA, Lergen MT, Buckley HR. Production and characterization of three monoclonal antibodies to *Candida albicans* proteins. *Infect Immun* 1984; 43: 1012-1018.
 48. Takesue Y, Kakehashi M, Ohge H, Imamura Y, Murakami Y, Sasaki M, Morifuji M, Yokoyama Y, Kouyama M, Yokoyama T, Sueda T. Combined assessment of β -D-glucan and degree of *Candida* colonization before starting empiric therapy for candidiasis in surgical patients. *World J Surg* 2004; 28: 625-30.
 49. Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Nolla-Salas J, Carceller A, Tur C. Candiduria in non-neutropenic critically ill surgical patients. Detection of IgA, IgG and IgM antibodies to *Candida albicans* by germ tube immunofluorescence. *Mycoses* 1997; 40: 439-444.
 50. van Deventer AJM, van Vliet HJA, Voogd L, Hop WCJ, Goessens WHF. Increased specificity of antibody detection in surgical patients with invasive candidiasis with cytoplasmic antigens depleted of mannan residues. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 994-997.
 51. van Deventer AJM, Goessens WHF, van Zeijl JH, Mouton JW, Michel MF, Verbrugh HA. Kinetics of anti-mannan antibodies useful in confirming invasive candidiasis in immunocompromised patients. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 125-131.
 52. Verduyn Lunel FM, Voss A, Kuijper EJ, Gelinck LBS, Hoogerbrugge PM, Liem KL, Kullberg BJ, Verweij PE. Detection of the *Candida* antigen mannan in cerebrospinal fluid specimens from patients suspected of having *Candida* meningitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 867-870.
 53. Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20: 864-70.