



Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol



Utilidad de los marcadores biológicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora

José Pontón

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

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 2 de febrero de 2009

Aceptado el 9 de febrero de 2009

Palabras clave:

ADN
Anticuerpos
Antígeno
 β -1,3-D-glucano
Biomarcadores
Candida
Candidiasis invasora
Diagnóstico
Manano

Keywords:

Antibodies
Antigen
 β -1,3-D-glucan
Biomarkers
Candida
Diagnosis
DNA
Invasive candidiasis
Mannan

RESUMEN

Antecedentes: El diagnóstico de laboratorio de la candidiasis invasora se basa en la demostración de la invasión tisular por *Candida*, el cultivo del hongo en localizaciones corporales habitualmente estériles y en la detección de una serie de marcadores biológicos que incluyen algunos anticuerpos, el manano, el β -1,3-D-glucano y el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Candida*.

Objetivos: Descripción y evaluación de los resultados obtenidos en los estudios publicados sobre la utilidad de los marcadores biológicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora.

Métodos: Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed/Medline de la National Library of Medicine desde enero de 2000 sobre la utilidad de los marcadores biológicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora. Se utilizaron como palabras clave los términos: candidiasis, *Candida*, diagnóstico, biomarcadores, antígeno, anticuerpos, ADN, manano y β -1,3-D-glucano.

Resultados: Se seleccionaron 41 publicaciones relacionadas con el diagnóstico de la candidiasis invasora, utilizando marcadores biológicos, y se evaluaron los resultados obtenidos, fundamentalmente en relación con la sensibilidad y la especificidad de las pruebas estudiadas.

Conclusiones: Se están produciendo avances importantes en la utilización de marcadores biológicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora y algunos marcadores están comenzando a utilizarse en el establecimiento de un tratamiento antifúngico anticipado.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Usefulness of biological markers in the diagnosis of invasive candidiasis

ABSTRACT

Background: The laboratory diagnosis of invasive candidiasis is based on the demonstration of tissue invasion by *Candida*, the culture of the fungus in specimens from sterile body sites and the detection of a number of biomarkers including some antibodies, mannan, β -1,3-D-glucan and *Candida* DNA.

Aims: Description and evaluation of results obtained in published studies on the usefulness of biomarkers in the diagnosis of invasive candidiasis.

Methods: A search was performed in the PubMed/Medline database from the National Library of Medicine since January 2000 on the usefulness of biomarkers in the diagnosis of invasive candidiasis. Key words used included candidiasis, *Candida*, diagnosis, biomarkers, antigen, antibodies, DNA, mannan, and β -1,3-D-glucan.

Results: Forty one papers dealing with the use of biomarkers in the diagnosis of invasive candidiasis were selected and evaluated, paying special attention to the sensitivity and specificity obtained with the tests used.

Conclusions: Important advances are being reached in the use of biomarkers for the diagnosis of invasive candidiasis, and some of them are being used to start a preemptive therapy strategy.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

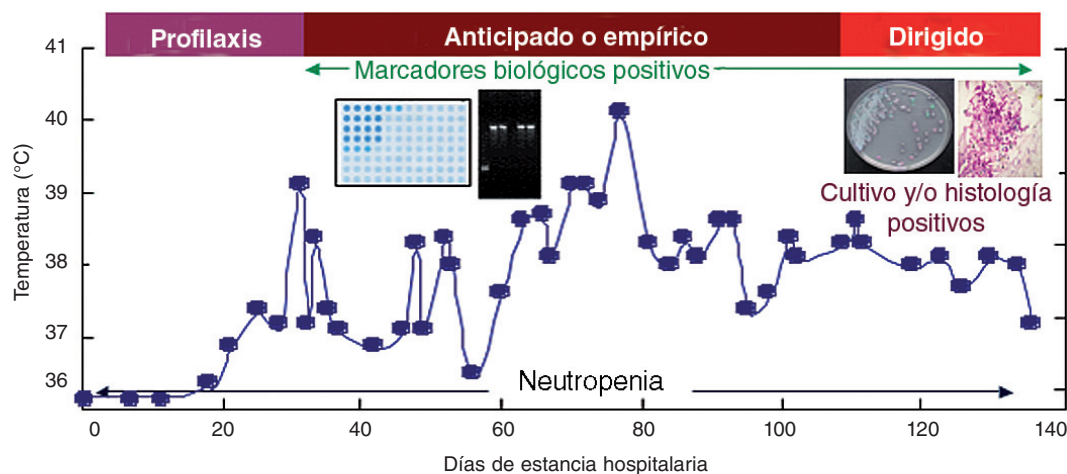


Figura 1. Estrategias terapéuticas utilizadas en el tratamiento de la candidiasis invasora en un paciente con neutropenia grave prolongada que presenta períodos febriles. El tratamiento anticipado se basa en la administración de antifúngicos después de la detección de una serie de marcadores biológicos y de imagen que anteceden a la aparición de los síntomas inespecíficos de la infección fúngica invasora y al diagnóstico definitivo.

La candidiasis invasora es una micosis que presenta una mortalidad alta (alrededor del 40%), especialmente en pacientes inmunodebilitados²⁰. Su diagnóstico es difícil, porque no hay signos ni síntomas específicos de la infección, y es difícil diferenciar la infección de la colonización por *Candida*. El diagnóstico convencional de la candidiasis invasora, que incluye la demostración de la invasión tisular por el hongo y su cultivo en localizaciones corporales habitualmente estériles, generalmente presenta una sensibilidad y especificidad bajas, y a menudo requiere procedimientos invasores que no pueden realizarse en muchos de los pacientes con sospecha de candidiasis invasora. Como consecuencia de estos problemas, el tratamiento antifúngico suele iniciarse con retraso, lo que influye de forma determinante en la mortalidad.

Con el fin de instaurar de forma temprana el tratamiento antifúngico para reducir la alta mortalidad de la candidiasis invasora, se han diseñado diversas estrategias terapéuticas que incluyen la profilaxis, el tratamiento anticipado, el tratamiento empírico y el tratamiento dirigido (fig. 1). El tratamiento anticipado se basa en la administración de antifúngicos después de detectar una serie de marcadores biológicos y de imagen que anteceden a la aparición de los síntomas inespecíficos de la infección fúngica invasora y al diagnóstico definitivo. Una vez iniciado el tratamiento antifúngico, los marcadores biológicos pueden ser de utilidad en el seguimiento de la eficacia terapéutica. En este artículo se revisan los avances que se han obtenido en la detección de marcadores biológicos de utilidad en el diagnóstico y el seguimiento de la eficacia del tratamiento antifúngico en pacientes con candidiasis invasora.

Los marcadores biológicos en el diagnóstico de laboratorio de la candidiasis invasora

El diagnóstico de laboratorio de la candidiasis invasora se basa en 3 estrategias complementarias: la observación del hongo en la muestra clínica, el cultivo y la detección de marcadores biológicos, componentes que circulan por el torrente sanguíneo de los pacientes con candidiasis invasora^{23,40}. Actualmente, los marcadores biológicos de interés diagnóstico son el manano, el β -1,3-D-glucano, el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Candida* y algunos anticuerpos que se producen contra antígenos de la pared celular de *Candida*.

Manano

Los escasos estudios que se realizan en la actualidad sobre la detección de manano en pacientes con candidiasis invasora se han rea-

lizado con la prueba Platelia *Candida* Ag. La prueba es un ELISA (del inglés *enzyme linked immuno sorbent assay*) que detecta residuos de manosa unidos por enlaces α del manano, el antígeno mayoritario e inmunodominante de la pared celular de *Candida*. Su capacidad para inducir anticuerpos es tan grande que los anticuerpos antimanano están presentes en prácticamente todas las personas y forman complejos con el manano cuando pasa a la sangre. La liberación del manano de los inmunocomplejos que forma con los anticuerpos es probablemente el paso más crítico de la prueba de detección y, junto con la transitoriedad de la mananemia, son la causa de la sensibilidad baja de la prueba, que suele estar entre el 40 y el 70%^{3,23,39,46,48}. La prueba se realiza normalmente en suero, pero se han comunicado buenos resultados en líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningitis por *Candida* demostrada por cultivo⁵³.

Un aumento de la sensibilidad diagnóstica de la detección de manano con la prueba Platelia *Candida* Ag puede obtenerse al complementarla con la detección de residuos de manosa unidos por enlaces β , ya que ambos antígenos tienen cinéticas de aclaramiento diferentes. La detección combinada de ambos antígenos alcanzó una sensibilidad diagnóstica del 90%, una especificidad del 95%, un valor predictivo positivo del 79% y un valor predictivo negativo del 97%, precediendo la detección de manano al cultivo una media de 4,7 días en el 55% de los pacientes⁴⁷. Una segunda posibilidad puede ser el inmunoanálisis Unimedi *Candida* monotest (Unitica Ltd. [Japón]), una prueba comercializada recientemente que en un trabajo se ha mostrado más sensible que el Platelia *Candida* Ag (el 82 frente al 53%), sobre todo para el diagnóstico de las infecciones por *Candida parapsilosis*¹⁷.

β -1,3-D-glucano

El glucano es un componente de la pared celular fúngica formado por monómeros de glucosa unidos con enlaces β -1,3 y β -1,6. El β -1,3-D-glucano se libera durante la infección y puede detectarse en los líquidos biológicos (principalmente suero) de pacientes con distintos tipos de micosis invasoras. El β -1,3-D-glucano se detecta en pacientes con candidiasis, aspergilosis, neumocistosis y algunos con criptococosis, pero no en las zgomosis. Por tanto, una prueba positiva puede utilizarse como marcador de infección fúngica, pero no permite identificar la especie⁴¹.

Actualmente hay varias pruebas comercializadas para detectar β -1,3-D-glucano: Fungitec G (Seikagaku Kogyo Corporation [Japón]), Wako (Wako Pure Chemical Industries [Japón]) y B-G Star (Maruha Corporation [Japón]) que se utilizan en Japón, y Fungitell (Associates

Tabla 1
Comparación de 4 pruebas comerciales para la detección de β -1,3-D-glucano

Variable	Fungitec G	Wako	B-G Star	Fungitell
Año de aprobación	1995	1996	2001	2004
Método de ensayo	Cinético cromogénico	Cinético turbidométrico	Punto final cromogénico	Cinético cromogénico
Muestra	Suero o plasma	Suero o plasma	Suero o plasma	Suero
Pretratamiento	Álcali	Dilución y calentamiento	Dilución y calentamiento	Álcali
Origen del lisado	<i>Tachypleus tridentatus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>	<i>Tachypleus tridentatus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>
Punto de corte, pg/ml	20	11	11	60 o 80
Rango de medida, pg/ml	3,9-500	6-600	1,2-120	31,25-500
Tiempo de realización (min)	30	90	30	40

Adaptada de Obayashi et al³¹.

Tabla 2
Utilidad diagnóstica de la detección de β -1,3-D-glucano en pacientes con candidiasis invasora

Pacientes	Prueba	Corte (pg/ml)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia
Candidiasis probada	Fungitell	≥ 80	77,6	92,4	Ostrosky-Zeichner et al ³²
Candidemia	Fungitell	≥ 80	93,3	77,2	Pickering et al ³⁷
Candidiasis invasora, neutropénicos	Fungitell	≥ 120	83,3	89,6	Pazos et al ³⁴
Candidemia	Wako	≥ 11	95	84	Fujita et al ¹⁷
Candidiasis invasora, neutropénicos	Wako	≥ 7	59	96	Senn et al ⁴⁹
Candidemia	Fungitell	≥ 80	47	100	Alam et al ³

of Cape Cod Inc. [Estados Unidos]), que se está utilizando en Estados Unidos y Europa. Aunque las 4 pruebas detectan β -1,3-D-glucano, cada una presenta diferencias en su reactividad con el polisacárido y, por tanto, son necesarios puntos de corte diferentes para cada prueba. Las diferencias en reactividad con el β -1,3-D-glucano presentadas por cada prueba pueden reflejarse en la sensibilidad final de la prueba. Así, se ha comunicado que Fungitec G es más sensible que Wako³¹. En la tabla 1 se muestra un resumen de las características de estas pruebas.

Los resultados publicados recientemente indican que la detección de β -1,3-D-glucano es un buen marcador de enfermedad fúngica invasora y la prueba es positiva en un gran número de pacientes con candidiasis invasora (tabla 2).

Fungitell presenta una sensibilidad del 64,4%, una especificidad del 92,4%, un valor predictivo positivo del 89% y un valor predictivo negativo del 73% en el diagnóstico de la infección fúngica invasora, utilizando un punto de corte de 80 pg/ml³². En este estudio, de los 107 pacientes con candidiasis invasora, el 77,6% fueron positivos utilizando un punto de corte de 80 pg/ml. También con Fungitell, pero con un punto de corte ≥ 120 pg/ml, Pazos et al³⁴ obtuvieron una sensibilidad del 83,3%, una especificidad del 89,6%, un valor predictivo positivo del 62,5% y un valor predictivo negativo del 96,3% en el diagnóstico de la candidiasis invasora en 35 pacientes que presentaban un riesgo alto de tener una infección fúngica invasora y en los que se diagnosticaron 3 candidiasis probadas y 3 candidiasis posibles³³. La detección de β -1,3-D-glucano fue positiva en el 100% de las candidiasis probadas y en el 66% de las candidiasis probables. Se observaron un 10,3% de falsos positivos, y uno de los 3 casos probablemente estaba relacionado con una bacteriemia por *Escherichia coli*. En estos casos, el análisis de la cinética de los valores de β -1,3-D-glucano en cada paciente fue de utilidad para detectar los falsos positivos, ya que se produjeron ascensos y descensos abruptos, una observación que también se ha realizado en pacientes con aspergilosis invasora³³. La detección de β -1,3-D-glucano fue un marcador temprano que precedió a la fiebre, al diagnóstico clínico y radiológico, y al tratamiento antifúngico, en la mayoría de los pacientes.

En algunos estudios, la especificidad del Fungitell ha sido baja, debido a la detección de β -1,3-D-glucano en pacientes con bacteriemia. Pickering et al³⁷ estudiaron la utilidad de la prueba en varios grupos de pacientes y observaron que 13 de 15 pacientes (87%) con candidemia fueron positivos. Sin embargo, también lo fueron 14 de 25 pacientes (56%) con bacteriemia. Estos autores obtuvieron una

sensibilidad del 93,3%, una especificidad del 77,2%, un valor predictivo positivo del 51,9% y un valor predictivo negativo del 97,8% en el diagnóstico de la candidiasis invasora, y sugieren que el Fungitell puede ser más útil para excluir la existencia de una infección fúngica invasora. Digby et al¹⁴ también han observado valores elevados de β -1,3-D-glucano en 46 pacientes críticos, pero estos valores no eran diferentes de los encontrados en pacientes con bacteriemia. Los autores concluyeron que la prueba podría ser útil para excluir la existencia de una infección.

Estudios realizados en modelos experimentales han puesto de manifiesto que la detección de β -1,3-D-glucano con la prueba Fungitell puede ser de utilidad en el diagnóstico de las candidemias asociadas a catéteres y en la meningoencefalitis candidiásica. Utilizando un modelo experimental de candidiasis asociada a biopelículas en catéter venoso central, Nett et al³⁰ observaron que los valores de β -1,3-D-glucano en los animales con candidiasis asociada a catéter eran 10 veces mayores que los observados en animales infectados por vía intravenosa con la misma cepa de *C. albicans*, a pesar de que la extensión de la infección en el riñón era menor. Petraitiene et al³⁶ detectaron β -1,3-D-glucano en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de conejos neutropénicos con meningoencefalitis candidiásica y observaron que la prueba era muy sensible (100%) en contraste con el cultivo (8,1%). La negativización de *C. albicans* en los hemocultivos no predijo la erradicación del hongo en el LCR. Sin embargo, los valores de β -1,3-D-glucano en el LCR predijeron la respuesta terapéutica a la micafungina y se correlacionaron con la extensión de la infección en el tejido cerebral.

Fungitec G presenta una sensibilidad del 85,4%, una especificidad del 95,2%, un valor predictivo positivo del 70,4% y un valor predictivo negativo del 98% en el diagnóstico de la infección fúngica invasora utilizando un punto de corte de 60 pg/ml³¹. Diecisiete de los 21 pacientes con hemocultivos positivos (11 casos por *Candida*) presentaron valores de β -1,3-D-glucano por encima del corte.

La utilidad diagnóstica de la prueba Wako se ha estudiado en varios trabajos. Fujita et al¹⁷ estudiaron los valores de β -1,3-D-glucano en 76 pacientes con candidemia y obtuvieron una sensibilidad y una especificidad diagnóstica del 95 y el 84%, respectivamente. En el 85% de los pacientes positivos para β -1,3-D-glucano, la prueba se anticipó al hemocultivo. Senn et al⁴⁹ estudiaron a 95 pacientes con neutropenia en los que se diagnosticaron 30 infecciones fúngicas invasoras probadas o probables (17 candidiasis, 13 aspergilosis y 2 mixtas), y se obtuvo una sensibilidad del 63%, una especificidad del 96%, un valor

Tabla 3Características y aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada para detectar *Candida* spp.

Técnica	Muestra	Especies detectadas	Diana amplificada	Sensibilidad	Especificidad (%)	Referencia
PCR	Sangre, humano	<i>C. albicans</i>	18S ADNr	4-5 UFC /ml-70%	100	Sakai et al ⁴⁵
PCR	Sangre, ratón	<i>C. albicans</i>	ADNr	100-150 UFC/ml-100%	-	Van Deventer et al ⁵²
PCR	Sangre, humano	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.	18S ADNr	1 UFC/ml-100%	98	Einsele et al ¹⁵
PCR semianidada	Sangre, ratón	<i>Candida</i> spp.	ITS2	20 UFC/ml	100	Uno et al ⁵¹
PCR semianidada	Sangre, humano	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i>	ADNr	20 fg ADN/ml-100%	100	Ahmad et al ¹
PCR semianidada	Sangre, humano	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i>	ADNr	92,5%	100	Alam et al ³
PCR-análisis de restricción	Sangre, humano	<i>Candida</i> spp.	Citocromo P450	5 UFC/ml-92,8%	75	Morace et al ²⁸
PCR panfúngica	Sangre, humano	<i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus</i> spp.	ITS3	80%	95,6	Badiee et al ⁶
PCR-ELISA	Sangre, humano	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	ITS3	83,3%	91,7	Badiee et al ⁸
PCR-ELISA	Sangre, humano	<i>C. albicans</i>	ADNr	2 UFC/ml-63%	96	Badiee et al ⁷
PCR tiempo real (LightCycler)	Sangre, suero y orina, humano	<i>C. albicans</i>	CaMP65	5-10 UFC/ml-100%	100	Arancia et al ⁵
PCR tiempo real (LightCycler)	Sangre, pacientes de riesgo alto	<i>C. albicans</i> y otras <i>Candida</i> spp.	ADNr	1-5 UFC/ml-95%	97	White et al ⁵⁴
PCR tiempo real (LightCycler)	Sangre, biopsias, humano	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	18S ADNr	2 UFC/ml	100	Klingspor et al ²²
PCR tiempo real (TaqMan)	Sangre, humano	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. krusei</i>	18S ADNr	0,2-2,3 copias ml-90,9%	100	McMullan et al ²⁷

UFC: unidades formadoras de colonias.

Adaptada de Laín et al²³.

predictivo positivo del 79% y un valor predictivo negativo del 91% en el diagnóstico de la infección fúngica invasora utilizando como criterio de positividad 2 valores consecutivos de β -1,3-D-glucano ≥ 7 pg/ml. La detección de β -1,3-D-glucano se positivizó antes de que se obtuviesen evidencias clínicas, microbiológicas, radiológicas y/o histopatológicas de las infecciones fúngicas invasoras. En el subgrupo de pacientes con candidiasis invasora, la prueba presentó una sensibilidad del 59%, una especificidad del 96%, un valor predictivo positivo del 67% y un valor predictivo negativo del 94%. Se obtuvieron resultados negativos en la detección de β -1,3-D-glucano en 2 candidiasis invasoras probadas (una candidiasis diseminada por *Candida humicola* y una candidemia por *Candida norvegensis*) y en 5 candidiasis invasoras probables con lesiones hepatoesplénicas.

La detección de β -1,3-D-glucano presenta resultados falsos positivos y negativos que deben tenerse en cuenta para obtener el máximo rendimiento de la prueba. Dado que el β -1,3-D-glucano se encuentra ampliamente distribuido en un gran número de materiales, una de las causas de falsa positividad es la contaminación de los materiales de laboratorio con β -1,3-D-glucano. Además, se han descrito resultados falsos positivos en pacientes en hemodiálisis con membranas de acetato de celulosa, en contacto con gases y esponjas quirúrgicas o en tratamientos con inmunoglobulinas humanas intravenosas, polisacáridos antitumorales (lentinano y polisacárido K), albúmina, factores de coagulación, proteínas plasmáticas, quimioterapia antitumoral, amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam. Los sueros hemolizados y algunas bacteriemias por grampositivos (*Streptococcus*) y gramnegativos (*Alcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa*) son otras causas conocidas de resultados falsos positivos. Los falsos negativos se asocian con la existencia de sueros hiperpigmentados (bilirrubina y triglicéridos elevados), el tratamiento empírico o profilaxis antifúngica y con la especie infectante, ya que no todas liberan la misma cantidad de β -1,3-D-glucano durante la infección.

La detección del β -1,3-D-glucano se está consolidando en el diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras y una prueba positiva se considera un criterio microbiológico de enfermedad invasora probable en los criterios conjuntos de la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) y el Mycoses Study Group del NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) de Estados Unidos¹³. Sin embargo, ya que el β -1,3-D-glucano es un marcador panfúngico, la prueba debe complementarse con otras que permitan la identificación del género o especie fúngica infectante.

La detección del β -1,3-D-glucano puede ser de ayuda en el establecimiento del tratamiento antifúngico anticipado. Akamatsu et al² determinaron los valores de β -1,3-D-glucano en el plasma de 180 trasplantados de hígado durante el año posterior al trasplante. El tratamiento anticipado comenzó si los valores de β -1,3-D-glucano eran ≥ 40 pg/ml en 2 muestras consecutivas y continuó hasta que los valores de β -1,3-D-glucano eran ≤ 20 pg/ml. En 14 de 40 pacientes en los que se estableció un tratamiento anticipado se pudo demostrar una infección fúngica invasora (7 candidiasis), siendo la mortalidad debida a la infección fúngica del 0,6%.

ADN

La detección de ADN microbiano utilizando la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real ha supuesto un gran avance en el campo del diagnóstico de algunas enfermedades infecciosas causadas por bacterias y virus. Sin embargo, en el diagnóstico de la candidiasis invasora, los avances son muy modestos, ya que la mayoría de las publicaciones utilizan técnicas desarrolladas en cada laboratorio y no hay pruebas comercializadas, por lo que no hay una prueba estandarizada que pueda utilizarse de forma universal. Como consecuencia de este hecho, la detección de ADN fúngico no se ha incluido entre los criterios microbiológicos de enfermedad invasora fúngica probable establecidos por la EORTC/MSG de Estados Unidos¹³. El desarrollo de pruebas comercializadas en el futuro es fundamental para la realización de estudios en los que se pueda evaluar, por diferentes grupos de trabajo, la utilidad de la detección de ADN de *Candida* como marcador biológico de la candidiasis invasora. Una revisión reciente de la utilidad de la detección de ADN de *Candida* en el diagnóstico de la candidiasis invasora puede encontrarse en los trabajos de Laín et al²³, Arancia et al⁴, Colom et al¹², Ellepola y Morrison¹⁶ y Bretagne y Costa¹⁰.

Actualmente hay una serie de problemas que deben resolverse en la detección de ADN para el diagnóstico de la candidiasis invasora, incluidos la elección de la muestra óptima (suero o sangre completa; ambas muestras pueden ser complementarias ya que el origen del ADN puede ser diferente: libre en el suero y procedente de células inviables e intracelular en la sangre completa, procedente de células viables⁹), el método de extracción del ADN, la especificidad de los cebadores, el formato de la PCR, la detección y la identificación de varias especies del género *Candida* simultáneamente (ya que no todas las

Tabla 4

Combinaciones de técnicas que detectan marcadores biológicos para el diagnóstico de la candidiasis invasora

Marcadores	Pacientes	Sensibilidad ^a (%)	Especificidad ^a (%)	Sensibilidad ^b (%)	Especificidad ^b (%)	Observaciones	Referencia
Manano con enlaces β y manano con enlaces α	Candidiasis invasora	85	95	69	98	Las cinéticas de eliminación de ambos marcadores fueron diferentes. Los mejores resultados se obtuvieron detectando manano con enlaces α	Sendid et al ⁴⁷
Manano, anticuerpos antimanano	Candidiasis invasora	80	93	40	98	Las cinéticas de ambos marcadores fueron complementarias. Los mejores resultados se obtuvieron detectando manano	Sakai et al ⁴⁵
Betaglucano, manano, PCR, anticuerpos antimanano	Candidemia	100	92,3	88	100	La PCR detectó <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i> . Los mejores resultados se obtuvieron detectando ADN	Alam et al ³
Betaglucano, anticuerpos antimicelio	Neutropenia	83,3	100	83,3	89,6	La combinación fue útil para identificar los falsos positivos de cada prueba. Los mejores resultados se obtuvieron detectando betaglucano	Pazos et al ³⁴
PCR, manano	Riesgo alto	100	97	95	97	La combinación es necesaria para ayudar al diagnóstico. Los mejores resultados se obtuvieron detectando ADN	White et al ⁵⁴
Betaglucano, manano	Riesgo alto	80,7	44,5	87	70,4	La combinación redujo la especificidad. Los mejores resultados se obtuvieron detectando betaglucano	Persat et al ³⁵

ADN: ácido desoxirribonucleico; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

^aCalculada para el conjunto de marcadores utilizados.^bDel mejor marcador biológico individual.

especies de *Candida* tienen la misma sensibilidad a los antifúngicos), el coste y, sobre todo, la interpretación de un resultado positivo para poder diferenciar una infección de una colonización, especialmente en pacientes con colonización alta por *Candida*. La introducción de la PCR en tiempo real y los métodos automáticos de extracción han solucionado algunos de los problemas asociados con la contaminación de la muestra y con el tiempo de realización de la prueba.

Los estudios realizados hasta el momento indican que la detección de ADN de *Candida* para el diagnóstico de la candidiasis invasora es sensible y específica (tabla 3) y en algunos casos se ha utilizado para establecer el comienzo del tratamiento antifúngico y el seguimiento de su eficacia^{19,26}. La sensibilidad de la técnica es muy necesaria, ya que en las fases iniciales de la infección el número de unidades formadoras de colonias en los tejidos puede ser muy bajo. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, el principal problema en la actualidad es la reproducibilidad entre laboratorios que impide obtener resultados ampliamente validados.

Anticuerpos

Los avances en el campo de la detección de anticuerpos en el diagnóstico de la candidiasis invasora se han producido en la detección de anticuerpos antimicelio y frente a una serie de antígenos recombinantes de *C. albicans*. La comercialización de la prueba *Candida albicans* IFA IgG, para la detección de anticuerpos antimicelio, ha conseguido la estandarización de la técnica y permite el diagnóstico de la candidiasis invasora con una sensibilidad del 84,4% y una especificidad del 94,7%²⁹, resultados similares a los obtenidos con la prueba no comercializada original^{18,21,42-44}.

Los anticuerpos antimicelio van dirigidos frente a antígenos de *C. albicans* que se expresan mayoritariamente en la superficie de la pared celular de la fase micelial del hongo y que se asocia con la invasión tisular. Dado que algunos de estos antígenos pueden obtenerse en el laboratorio como proteínas recombinantes, Laín et al²⁴ desarrollaron un ELISA para detectar anticuerpos contra el fragmento aminoterminal de la Hwp1, una proteína específica de la fase micelial de *C. albicans*³⁰. Con esta prueba se consiguió una sensibilidad del 88,9%, una especificidad del 82,6%, un valor predictivo positivo del 80% y un valor predictivo negativo del 90,2%. Estos valores fueron muy similares a los obtenidos al detectar anticuerpos antimicelio (el 80,6, el

91,1, el 87,9 y el 85,4%, respectivamente). La cinética de ambos anticuerpos fue similar, a pesar de que los pacientes con infección por especies diferentes de *C. albicans* suelen tener títulos más bajos de anticuerpos anti-Hwp1 que los infectados por *C. albicans*.

Clancy et al¹¹ utilizaron un ELISA para evaluar la respuesta de anticuerpos séricos frente a 15 antígenos recombinantes de *C. albicans* en 60 pacientes con candidiasis invasora debida a diferentes *Candida* spp. y en 24 controles sin infección. Los antígenos utilizados comprendían proteínas de la pared celular (Bgl2p, Muc1p-1 y Muc1p-2), enzimas glicolíticas localizadas en la pared celular (Eno1p, Fba1p, Gap1p, Pkg1p-1 y Pkg1p-2), proteínas intracelulares localizadas en la pared celular (Not5p, Met6p-1 y Met6p-2) y proteínas intracelulares probablemente no localizadas en la pared celular (Car1p, Rbt4p, Set1p e IPF9162). La media de la respuesta inmunoglobulina (Ig) G frente a los 15 antígenos fue significativamente más alta en los pacientes con candidiasis invasora que en los controles. Al utilizar un análisis diferenciador, que incluía la respuesta IgG frente a los 15 antígenos, se obtuvo un modelo de predicción matemática que identificó a los pacientes con candidiasis invasora con una sensibilidad del 96,6% y una especificidad del 95,6%. Con un modelo de predicción más refinado que comprendía la respuesta IgG frente a 4 antígenos (Set1p, Eno1p, Pkg1p-2 y Muc1p-2), se obtuvieron resultados idénticos a los obtenidos con todos los antígenos. Estos resultados confirman los obtenidos por Laín et al²⁵, los cuales detectaron anticuerpos frente a una enolasa recombinante de *C. albicans* con el *Candida* enolasa ELISA IgG kit (Laboratorios Vircell, Granada [España]) y se obtuvo una sensibilidad del 81%, una especificidad del 83,9%, un valor predictivo positivo del 79,1% y un valor predictivo negativo del 85,5% en el diagnóstico de la candidiasis invasora. Los anticuerpos contra la enolasa de *C. albicans* asociada a la pared celular podrían tener valor pronóstico, ya que Pitarch et al³⁸ han observado que los pacientes con candidiasis invasora que presentaban estos anticuerpos tenían un riesgo reducido de mortalidad a los 2 meses. Estos autores también han observado que los anticuerpos frente a la 1,3-β-glucosidasa del glucano y a la fosfoglicerato cinasa de la pared celular de *C. albicans* predecían la candidiasis invasora en los pacientes estudiados.

Utilizando un corte > 10 AU/ml, la detección de anticuerpos antimanano presenta una sensibilidad baja (47%), pero una especificidad alta (100%)³. Sin embargo, en combinación con otros marcadores biológicos, la sensibilidad puede aumentar al 100%. Sendid et al⁴⁸ han

combinado la detección de anticuerpos antimanano con la detección de manano de *C. albicans*, anticuerpos contra el manano de *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) y anticuerpos contra fragmentos del glucano (ALCA) y quitina (ACCA) en el diagnóstico de la candidemia, obteniendo un 100% de sensibilidad diagnóstica. Los valores de ACCA, ASCA y ALCA se encontraban elevados en los pacientes con candidemia, aunque los valores de ASCA y ALCA no fueron diferentes de los encontrados en pacientes con enfermedad de Crohn.

Combinaciones de marcadores biológicos

Dado que todas las técnicas utilizadas en el diagnóstico de laboratorio de la candidiasis invasora tienen limitaciones, la combinación de técnicas diagnósticas es una posibilidad que se recomienda en muchos trabajos, porque los resultados obtenidos con una técnica pueden suplir las deficiencias de las otras⁴⁰. La realización de varias pruebas diagnósticas presenta el inconveniente de la complejidad de realización y de su elevado coste, pero puede ser necesaria para obtener resultados óptimos. Sin embargo, en algunos estudios, la combinación no ha dado resultados satisfactorios. Prácticamente, se han estudiado todas las combinaciones posibles en el diagnóstico de la candidiasis invasora, incluidos antígenos y anticuerpos, antígenos y ADN, y antígenos, metabolitos y ADN. En la tabla 4 se muestra un resumen de estas combinaciones.

Conclusiones

La detección combinada de algunos marcadores biológicos de la candidiasis invasora como el manano, el β -1,3-D-glucano, la detección de anticuerpos antimicelio y frente a algunos antígenos recombinantes, así como la detección de ADN de *Candida*, puede ser de importancia no sólo en el diagnóstico de la candidiasis invasora, sino también en la evolución de las estrategias terapéuticas, y en particular en el establecimiento de un tratamiento antifúngico anticipado. Este tratamiento podría reemplazar al tratamiento empírico, una vez que se consolide el uso de estos marcadores²⁰.

Ya que el diagnóstico de la candidiasis invasora, basado en la detección de un marcador biológico en una única muestra, carece de sensibilidad, es necesario estudiar muestras seriadas, tomadas teniendo en cuenta la cinética de cada marcador, mientras el paciente presenta un riesgo alto de tener la micosis.

Agradecimiento

La investigación del autor se ha financiado con los proyectos PI070376 del Fondo de Investigación Sanitaria, IT-264-07 del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco y Saiotek del Departamento de Industria, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco.

Declaración del autor

El autor no tiene nada que declarar.

Bibliografía

- Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2483-2489.
- Akamatsu N, Sugawara Y, Kaneko J, Tamura S, Makuuchi M. Preemptive treatment of fungal infection based on plasma (1 \rightarrow 3) β -D-glucan levels after liver transplantation. *Infection.* 2007;35:346-351.
- Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU. Comparative evaluation of (1,3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia *BMC Infectious Diseases.* 2007;7:103.
- Arancia S, Sandini S, Cassone A, De Bernardis F. Use of 65-kDa Mannoprotein gene primers for real-time identification of *Candida albicans*. *Curr Fungal Infect Rep.* 2008;2:214-220.
- Arancia S, Carattoli A, La Valle R, Cassone A, De Bernardis F. Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in Real Time PCR identification of *Candida albicans* in biological samples. *Mol Cell Probes.* 2006;20:263-268.
- Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Malekhoseini SA. Invasive fungal infection in renal transplant recipients demonstrated by panfungal polymerase chain reaction. *Exp Clin Transplant.* 2007;5:624-629.
- Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Zakernia M, Haddadi P. Early detection of systemic candidiasis in the whole blood of patients with hematologic malignancies. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62:1-5.
- Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Malekhoseini S, Zeini F, Mirhendi H, Mahmoodi M. Prospective screening in liver transplant recipients by panfungal PCR-ELISA for early diagnosis of invasive fungal infections. *Liver Transpl.* 2007;13:1011-1016.
- Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicola-Chanoine M. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37:925-930.
- Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;45:361-368.
- Clancy CJ, Nguyen ML, Cheng S, Huang H, Fan G, Jaber RA, Wingard JR, Cline C, Nguyen MH. Immunoglobulin G responses to a panel of *Candida albicans* antigens as accurate and early markers for the presence of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1647-1654.
- Colom MF, Jover A, Ferrer C. Molecular biology in the diagnosis of deep-seated candidiasis in the critically ill non-neutropenic patient. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:26-28.
- 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 J, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhne M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE. 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.
- 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.
- Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA, Van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1353-1560.
- Ellepolá AN, Morrison C. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol.* 2005;43:65-84.
- Fujita S, Takamura T, Nagahara M, Hashimoto T. Evaluation of a newly developed down-flow immunoassay for detection of serum mannan antigens in patients with candidaemia. *J Med Microbiol.* 2006;55:537-543.
- García-Ruiz JC, Arilla MC, Regúlez P, Quindós G, Álvarez A, Pontón J. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol.* 1997;35:3284-3287.
- Hebart H, Klingspor L, Klingebiel T, Loeffler J, Tollemer J, Ljungman P, Wandt H, Schaefer-Eckart K, Dornbusch HJ, Meisner C, Engel C, Stenger N, Mayer T, Ringden O, Einsele H. A prospective randomized controlled trial comparing PCR-based and empirical treatment with liposomal amphotericin B in patients after Allo-SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2009. [En prensa.]
- Herbrecht R, Berceanu A. Beta-D-glucan detection test: a step toward preemptive therapy for fungal infections in leukemic patients? *Clin Infect Dis.* 2008;46:886-889.
- Iruetagoiena 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.
- Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:745-753.
- Láin A, Elguezabal N, Moragues MD, García-Ruiz JC, Del Palacio A, Pontón J. Contribution of serum biomarkers to the diagnosis of invasive candidiasis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008;8:315-325.
- Láin A, Elguezabal N, Brena S, García-Ruiz JC, Del Palacio A, Moragues MD, Pontón J. Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein 1. *BMC Microbiol.* 2007;7:35.
- Láin A, Moragues MD, García-Ruiz JC, Mendoza J, Camacho A, Del Palacio A, Pontón J. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect immunoglobulin G antibody to enolase for serodiagnosis of invasive candidiasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:318-319.
- Lin M-T, Lu H-S, Chen W-L. Improving efficacy of antifungal therapy by polymerase chain reaction-based strategy among febrile patients with neutropenia and cancer. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1621-1627.
- McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Paterson CC, Thompson G, Webb CH, Hay RJ. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis.* 2008;46:890-896.
- Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, D'Amore G, Leone G, Fadda G. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1871-1875.
- Moragues MD, Ortiz N, Iruetagoiena JR, García-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, Mendoza J, Quindós G, Pontón J. Evaluación de una nueva técnica comercializada (*Can-*

- didia albicans* IFA IgG) para el diagnóstico de la candidiasis invasiva. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:83-88.
30. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Andes D. β -1,3 glucan as a test for central venous catheter biofilm infection. *J Infect Dis.* 2007;195:1705-1712.
 31. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N. Reappraisal of the serum (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections. A study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1864-1870.
 32. 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.
 33. Pazos C, Pontón J, Del Palacio A. Contribution of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol.* 2005;43:299-305.
 34. Pazos C, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, Del Palacio A. Diagnostic potential of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan and anti-*Candida albicans* germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:209-215.
 35. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1009-1013.
 36. Petraitiene R, Petraitis V, Hope WW, Mickiene D, Kelaher AM, Murray HA, Mya-San C, Hughes JE, Cotton MP, Bacher J, Walsh TJ. Cerebrospinal fluid and plasma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan as surrogate markers for detection and monitoring of therapeutic response in experimental hematogenous *Candida* meningoencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:4121-4129.
 37. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1-3)- β -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5957-5962.
 38. Pitarch A, Jimenez A, Nombela C, Gil C. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5:79-96.
 39. Pontón J. El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:20-25.
 40. Pontón J, Del Palacio A. Avances y limitaciones del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por levaduras. *Rev Iberoam Micol* 2007;24:181-186.
 41. Pontón J, Moragues MD. ¿Es útil la detección de β -(1 \rightarrow 3)-D-glucano en el diagnóstico de la aspergilosis invasora? En: Pontón J, editor. Guía de bolsillo de la aspergilosis invasora. 2.^a ed. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2008. p. 105-108.
 42. 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.
 43. Quindós G, Pontón J, Cisterna R. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ-tubes in the serodiagnosis of systemic candidosis. *Eur J Clin Microbiol.* 1987;6:142-146.
 44. 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.
 45. Sakai T, Ikegami K, Yoshinaga E, Uesugi-Hayakawa R, Wakizaka A. Rapid, sensitive and simple detection of *Candida* deep mycosis by amplification of 18S ribosomal RNA gene; comparison with assay of serum beta-D-glucan level in clinical samples. *Tohoku J Exp Med.* 2000;190:119-128.
 46. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1510-1517.
 47. 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.
 48. Sendid B, Dotan N, Nseir S, Savaux C, Vandewalle P, Standaert A, Zerimech F, Guery BP, Dukler A, Colombel JF, Poulain D. Antibodies against glucan, chitin, and *Saccharomyces cerevisiae* mannan as new biomarkers of *Candida albicans* infection that complement tests based on *C. albicans* mannan. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:1868-1877.
 49. Senn L, Robinson JO, Schmidt S, Knaup M, Asahi N, Satomura S, Matsuura S, Duvoisin B, Bille J, Calandra T, Marchetti O. 1,3- β -D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis.* 2008;46:878-885.
 50. Staab JF, Ferrer CA, Sundstrom P. Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 1996;271:6298-6305.
 51. Uno K, Sugiura S, Konishi M, Yasuda Y, Mikasa K, Kita E. Evaluation of diagnostic methods for *Candida albicans* translocation in a mouse model: seminested polymerase chain reaction, blood culture, and serological assays. *J Infect Chemother.* 2007;13:196-203.
 52. Van Deventer AJ, Goessens WH, Van Belkum A, Van Vliet HJA, Van Etten EWM, Verbrugh HA. Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis. *J Clin Microbiol.* 1995;33:625-628.
 53. Verduyn-Lunel FM, Voss A, Kuijper EJ, Gelinck LB, 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.
 54. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2181-2187.