



Avances y limitaciones del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por levaduras

José Pontón¹ y Amalia del Palacio²

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Lejona, Vizcaya, España; ²Servicio de Microbiología, Unidad de Micología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

Resumen En los últimos años los principales avances en el diagnóstico serológico de las micosis por hongos levaduriformes se han producido en el campo de la detección de anticuerpos y de (1-3)- β -D-glucano. La comercialización de la prueba *Candida albicans* IFA IgG y la detección de anticuerpos frente a los antígenos recombinantes Hwp1 y enolasa son las aportaciones más importantes en el primero de los campos. La detección de (1-3)- β -D-glucano se confirma como un buen marcador para el diagnóstico de la candidiasis invasora. Los estudios más recientes sugieren que será necesaria la combinación de dos técnicas que detecten antígeno, anticuerpos, (1-3)- β -D-glucano y ADN para optimizar el diagnóstico de las infecciones sistémicas por levaduras.

Palabras clave Micosis, Candidiasis invasora, *Candida*, *Candida* spp., Levaduras, Diagnóstico

Advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeasts infections

Summary In the last years, the main advances in the serological diagnosis of mycoses caused by yeasts have occurred in the area of antibody and (1-3)- β -D-glucan detection. Commercialization of the *Candida albicans* IFA IgG test and detection of antibodies against recombinant antigens Hwp1 and enolase are the most important contributions to the first area. Detection of (1-3)- β -D-glucan confirms its usefulness as a good marker for the diagnosis of invasive candidiasis. The most recent studies suggest that combination of two tests to detect antigen, antibodies, (1-3)- β -D-glucan and DNA will be needed to optimize the diagnosis of systemic yeast infections.

Key words Mycoses, Invasive candidiasis, *Candida*, *Candida* spp., Yeasts, Diagnosis

Incidencia de las infecciones por hongos levaduriformes

Las micosis por hongos levaduriformes constituyen las infecciones más importantes causadas por hongos en el ser humano. Los agentes etiológicos de estas micosis son numerosos, destacando *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp. y *Saccharomyces* spp. Su incidencia global se desconoce, pero existen datos que indican

que está aumentando en los últimos años [33]. Sin embargo, se han descrito descensos en la incidencia de las micosis sistémicas por hongos levaduriformes en pacientes trasplantados, en los que está aumentando la incidencia de micosis por hongos filamentosos [17,38].

La candidiasis invasora es la micosis sistémica por hongos levaduriformes más importante en nuestro país, siendo la quinta causa de las bacteriemias en el estudio EPINE realizado entre los años 1990 y 1999 [2]. Estas infecciones se asocian con una alta mortalidad, que oscila en el mismo hospital del 38% entre los años 1983 y 1986 al 49% entre 1997 y 2001 [11,42]. La utilización profiláctica o anticipada de antifúngicos está produciendo cambios importantes en la incidencia de las candidiasis. Así, aunque el número de personas con riesgo de desarrollar una candidemia continúa aumentando en los hospitales actuales y la incidencia global de la candidemia está aumentando desde la década de 1980, la incidencia de la candidemia por *Candida albicans* está disminuyendo en algunos hospitales pero está aumentando la de la infección por *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* [33-35]. Todos estos cambios epidemiológicos deben ser tenidos en cuenta al analizar el diagnóstico de las micosis sistémicas causadas por hongos levaduriformes.

Dirección para correspondencia:

Dr. José Pontón
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco
Apartado 699, E-48080 Bilbao, Vizcaya, España
Tel.: (+34) 94 6012855
Fax: (+34) 94 6013495
E-mail: jose.ponton@ehu.es

©2007 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

El diagnóstico de laboratorio de las micosis por hongos levaduriformes

El diagnóstico tradicional de las micosis por hongos levaduriformes se basa en la observación directa, el cultivo y la serología [28]. El diagnóstico serológico se basa en la detección de diversos componentes fúngicos que se liberan durante la infección (Figura 1) y de la respuesta de anticuerpos que se produce contra ellos [25,29].

Avances en el diagnóstico temprano de las micosis por levaduras mediante la detección de antígenos

Tras un periodo en el que se realizaron muchos estudios sobre la utilidad de la detección de diversos componentes antigénicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora, en los últimos años se han producido muy pocos avances en este campo. La mayoría de los escasos trabajos en los que se detectan antígenos de *Candida* con fines diagnósticos se ha realizado en combinación con la detección de anticuerpos y serán comentados en un apartado posterior.

Prácticamente todos los estudios sobre detección de antígeno en pacientes con candidiasis invasora se realizan en la actualidad con la prueba Platelia *Candida* Ag. Esta prueba es un ELISA que detecta manano, el antígeno mayoritario de la pared celular de *Candida*, que debe ser liberado de su unión con los anticuerpos anti-manano para poder ser detectado en el suero de los pacientes. 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 los responsables de la baja sensibilidad de la prueba.

Dado que el Platelia *Candida* Ag detecta residuos de manosa unidos por enlaces α (α -Man), la combinación de esta prueba con un ELISA que detecta residuos de manosa unidos por enlaces β (β -Man) permite aumentar la sensibilidad diagnóstica, ya que ambos antígenos tienen cinéticas de aclaramiento diferentes. En un estudio retrospectivo con 90 sueros de 26 pacientes con candidemia por *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, se observó la presencia de α -Man y β -Man en 14 pacientes, de α -Man en cuatro y de β -Man en otros cuatro [37]. Aunque la detección de α -Man fue más sensible por muestra de suero que la detección de β -Man, 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%. En el 55% de los pacientes, la detección de manano precedió al cultivo por una media de 4,7 días [37].

Aunque se ha estudiado en un número reducido de pacientes, la detección de manano puede ser interesante en el diagnóstico de la meningitis por *Candida*. Verduyn-Lunel et al. [41] han detectado manano con el Platelia *Candida* Ag en cuatro de cinco pacientes con meningitis por *Candida* demostrada por cultivo del líquido cefalorraquídeo mientras que la prueba fue negativa en muestras de otros pacientes con otras infecciones del sistema nervioso central.

Avances en el diagnóstico temprano de las micosis por levaduras mediante la detección de anticuerpos

La comercialización de la prueba *Candida albicans* IFA IgG (Figura 2) es probablemente el avance más importante que se ha producido en los últimos años en el diag-

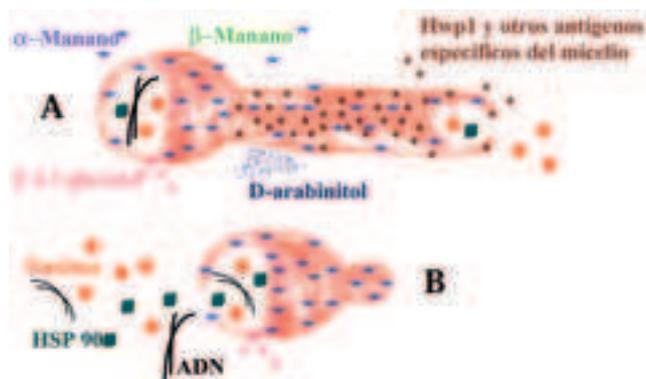


Figura 1. Principales componentes del micelio (A) y la levadura (B) de *C. albicans* de utilidad en el diagnóstico serológico de la candidiasis invasora. Modificado de Pontón [29].

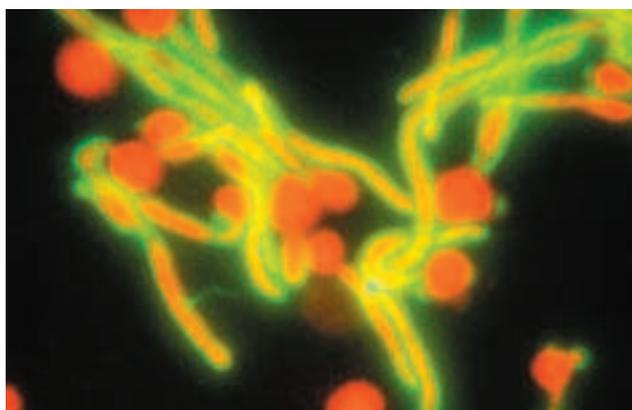


Figura 2. Anticuerpos anti-micelio de *C. albicans* detectados mediante la prueba *Candida albicans* IFA IgG (Laboratorios Viracell). Reproducido de Pontón [29].

nóstico de la candidiasis invasora mediante la detección de anticuerpos. Este hecho ha permitido la estandarización de la técnica y abre la puerta a su utilización en diferentes estudios. La prueba *Candida albicans* IFA IgG permite el diagnóstico de la candidiasis invasora con una sensibilidad del 84,4% y una especificidad del 94,7% [19], resultados similares a los obtenidos con la prueba no comercializada original [10,13,26,31,32].

El interés de la detección de los anticuerpos anti-micelio reside en que estos anticuerpos 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 estos antígenos se encuentran manosilados, es necesario eliminar los anticuerpos anti-manano que se encuentran presentes en el suero de la mayoría de los individuos para poder detectar los anticuerpos anti-micelio. Aunque el proceso de adsorción de los sueros es relativamente sencillo, complica la ejecución de la técnica.

Actualmente se han identificado varios genes que codifican antígenos específicos de la superficie de la pared celular del micelio de *C. albicans*, entre los que destacan *HWP-1*, *ALS3*, *ECE1* y *HYR1* [3,5,12,39]. El descubrimiento de estos genes abre la puerta a la producción de las proteínas recombinantes correspondientes, que al obtenerse en *Escherichia coli* no estarán manosiladas y, por tanto, no será necesaria la eliminación de los anticuerpos anti-manano de los sueros.

Esta aproximación ha sido seguida por Laín et al. [14] desarrollando un Western blot y un ELISA para detectar

anticuerpos contra el fragmento amino terminal de la Hwp1. Mientras que el Western blot no fue lo suficientemente sensible (27,8%) para realizar un diagnóstico de la candidiasis invasora, el ELISA 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 detectando anticuerpos anti-micelio (80,6%, 91,1%, 87,9% y 85,4%, respectivamente). Los resultados obtenidos detectando anticuerpos contra la Hwp1 fueron muy similares a los obtenidos detectando anticuerpos anti-micelio, sobre todo en los pacientes infectados por *C. albicans*. La cinética de ambos anticuerpos fue similar en un grupo de pacientes en los que se estudiaron varios sueros seriados. En general, los anticuerpos anti-Hwp1 se positivizaban antes del diagnóstico microbiológico de la candidiasis invasora y los títulos de anticuerpos aumentaban los días próximos al diagnóstico y disminuían si el paciente respondía al tratamiento antifúngico. Aunque 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*, Laín et al. [14] han detectado anticuerpos anti-Hwp1 en pacientes con candidemia por, *C. parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *C. glabrata* y *Candida dubliniensis*.

Un ensayo similar, pero utilizando la enolasa recombinante del *Candida* enolasa ELISA IgG kit (Laboratorios Vircell, Granada, España), ha sido utilizado por Laín et al. [15] para diagnosticar la candidiasis invasora detectando anticuerpos anti-enolasa con una sensibilidad del 81%, una especificidad del 83,9%, un valor predictivo positivo del 79,1% y un valor predictivo negativo del 85,5%.

Avances en el diagnóstico temprano de las micosis por levaduras mediante la detección de componentes no antigénicos

Los avances más significativos en el campo de la detección de componentes no antigénicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora se han producido en la detección de (1-3)- β -D-glucano y ADN.

(1-3)- β -D-glucano

El (1-3)- β -D-glucano es un componente de la pared celular de la mayoría de los hongos incluyendo *Candida*. La inexistencia de (1-3)- β -D-glucano en los tejidos de mamíferos y la ausencia de glucanasas que lo eliminen, hacen de esta molécula un buen marcador de infección fúngica. Al ser un marcador panfúngico, la identificación a nivel de género debe hacerse combinando la detección de (1-3)- β -D-glucano con otras técnicas como el galactomano en la aspergilosis invasora o los anticuerpos anti-micelio en la candidiasis invasora.

La detección de (1-3)- β -D-glucano se ha utilizado con éxito en el diagnóstico de la candidemia [21,22,24]. Recientemente, Ostrosky-Zeichner et al. [22] han observado que 87 de 107 pacientes con candidiasis invasora presentaban concentraciones séricas de (1-3)- β -D-glucano ≥ 60 pg/ml (sensibilidad 81,3%), mientras que 83 pacientes presentaron concentraciones séricas de (1-3)- β -D-glucano ≥ 80 pg/ml (sensibilidad 77,6%).

La detección de (1-3)- β -D-glucano puede ser también de interés para el diagnóstico de las candidemias asociadas a la existencia de biopelículas en catéteres, ya que Nett et al. [20] han observado que las biopelículas producidas por *C. albicans*, *C. glabrata*, y *C. parapsilosis*

liberan cantidades importantes de (1-3)- β -D-glucano que pueden ser detectadas por la prueba Fungitest. La confirmación de esta observación puede tener implicaciones diagnósticas y terapéuticas importantes, ya que las infecciones asociadas a catéteres se producen con una frecuencia del 1,2-4,5/1.000 paciente-catéter días [7,18] y las infecciones por *Candida* asociadas a catéteres son difíciles de diagnosticar y de tratar.

ADN

La detección de ADN utilizando la tecnología de la PCR en tiempo real es probablemente el mayor avance que se ha producido en este campo en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de las publicaciones utilizan técnicas desarrolladas en cada laboratorio que hacen difícil la comparación entre estudios. Como consecuencia de este problema, no existe por el momento ninguna prueba ampliamente evaluada que sea utilizada universalmente. El desarrollo de pruebas comercializadas en el futuro próximo probablemente solucionará este problema. Una revisión reciente de este apartado puede encontrarse en los artículos de Colom et al. [8] y Bretagne y Costa [6].

Uno de los problemas que todavía no se ha aclarado es si la detección de ADN fúngico es más sensible que el hemocultivo. La respuesta puede estar relacionada con la procedencia del ADN que se detecta en la muestra clínica. Si el ADN procede de células de *Candida* vivas, los resultados obtenidos con la PCR deberían de correlacionarse con los obtenidos en los hemocultivos. Se ha calculado que con los modernos métodos de extracción del ADN, se obtienen resultados reproducibles por PCR cuando existen 10 unidades formadoras de colonias (UFC) en los 200 μ l de muestra extraídos. Esto corresponde a 50 UFC/ml de sangre, por lo que es muy probable que un hemocultivo realizado con 10 ml de sangre también sea positivo, a no ser que el paciente esté siendo tratado con antifúngicos [6]. Si por el contrario el ADN que se detecta es ADN circulante, lo que explicaría el mayor rendimiento del suero frente a la sangre completa, la sensibilidad de la detección de ADN será mayor que la del hemocultivo. Esto puede llevar a plantear el significado real de resultados positivos con una PCR muy sensible. Otro problema a solucionar es la detección e identificación de varias especies del género *Candida* simultáneamente, ya que no todas las especies de *Candida* tienen la misma sensibilidad a los antifúngicos.

Además de detección de ADN fúngico para el diagnóstico de la candidiasis invasora, también se está utilizando para el diagnóstico de las micosis oftálmicas [40], en las que la PCR es más sensible que el cultivo. Esta técnica ha sido utilizada por Ferrer et al. [9] para el diagnóstico de una queratopatía cristalina infecciosa en un paciente con infección por *C. parapsilosis* y *Staphylococcus aureus*.

Combinación de técnicas

La combinación de dos técnicas diagnósticas es una posibilidad que se está utilizando cada vez más en el diagnóstico de la candidiasis invasora, ya que una técnica puede suplir las deficiencias de la otra [28].

Sendid et al. [36] estudiaron retrospectivamente la utilidad de la detección combinada de manano con la prueba Platelia *Candida* Ag con la detección de anticuerpos anti-manano con la prueba Platelia *Candida* Ab en 162 sueros de 43 pacientes con candidiasis invasora. La sensibilidad y la especificidad de la detección de anticuerpos

anti-manano fueron 53% y 94%, mientras que cuando se detectaron manano y anticuerpos anti-manano, la sensibilidad fue del 80% y la especificidad del 93%. Yera et al. [44] estudiaron la utilidad de las dos técnicas en relación con el hemocultivo y observaron que en el 73% de los pacientes la serología se adelantaba en dos días al hemocultivo. Puesto que las dos técnicas son complementarias, los pacientes que tenían anticuerpos anti-manano no solían tener mananemia y viceversa. Estos autores también observaron que los pacientes hematológicos solían tener mananemia, mientras que en los pacientes quirúrgicos se detectaba más frecuentemente anticuerpos anti-manano.

La detección combinada de anticuerpos y componentes no antigénicos también puede dar buenos resultados en el diagnóstico de la candidiasis invasora. Pazos et al. [23] han estudiado la utilidad diagnóstica de la detección combinada de anticuerpos anti-micelio y (1-3)- β -D-glucano en 35 pacientes que presentaban un riesgo alto de padecer una infección fúngica invasora [31] y en los que se diagnosticaron tres candidiasis probadas y tres candidiasis posibles [1]. Los dos marcadores fueron positivos en el 100% de las candidiasis probadas y en el 66% de las candidiasis probables. La detección de anticuerpos anti-micelio alcanzó una sensibilidad del 83,3%, una especificidad del 86,2%, un valor predictivo positivo del 55,5% y un valor predictivo negativo del 96,1%. La detección de (1-3)- β -D-glucano alcanzó 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%. Sin embargo, la detección combinada de ambos marcadores aumentó la especificidad y el valor predictivo positivo al 100%, ya que los fal-

sos positivos fueron diferentes en cada prueba (Figura 3). En general, los anticuerpos anti-micelio y los niveles de (1-3)- β -D-glucano se positivizaban antes del diagnóstico microbiológico de la candidiasis invasora y los títulos de anticuerpos anti-micelio y los niveles de (1-3)- β -D-glucano aumentaban los días próximos al diagnóstico y disminuían si el paciente respondía al tratamiento antifúngico.

White et al. [43] realizaron una comparación entre tres métodos independientes del cultivo: detección de ADN por PCR, detección de manano con el ELISA Platelia *Candida* Ag y detección de manano con la técnica de aglutinación de partículas de latex Pastorex *Candida*. En este último caso, los sueros fueron sometidos a un paso de ultrasonificación después de la rotura de los inmunocomplejos con el tampón de tratamiento y el calentamiento a 100 °C (UELA). Los dos pacientes con candidemia fueron positivos por PCR, mientras que solamente en uno de ellos se detectó manano por ELISA. El látex-UELA fue negativo en ambos casos. Diecisiete de las 18 candidiasis probables fueron positivas por PCR, 14 por ELISA y cinco por el látex-UELA. Trece de los pacientes con candidiasis probable fueron positivos por PCR y ELISA. De los 18 casos de candidiasis posible, siete fueron positivos por PCR, cinco por ELISA y cuatro por ambos métodos. Cuatro pacientes fueron positivos por el látex-UELA. Dos de los 67 pacientes a riesgo de infección fúngica fueron positivos por PCR y ELISA.

La detección de ADN de *Candida* por PCR presentó una sensibilidad del 95%, una especificidad del 97%, un valor predictivo positivo del 90,5% y un valor predictivo negativo del 98,5%. La detección de manano de *Can-*

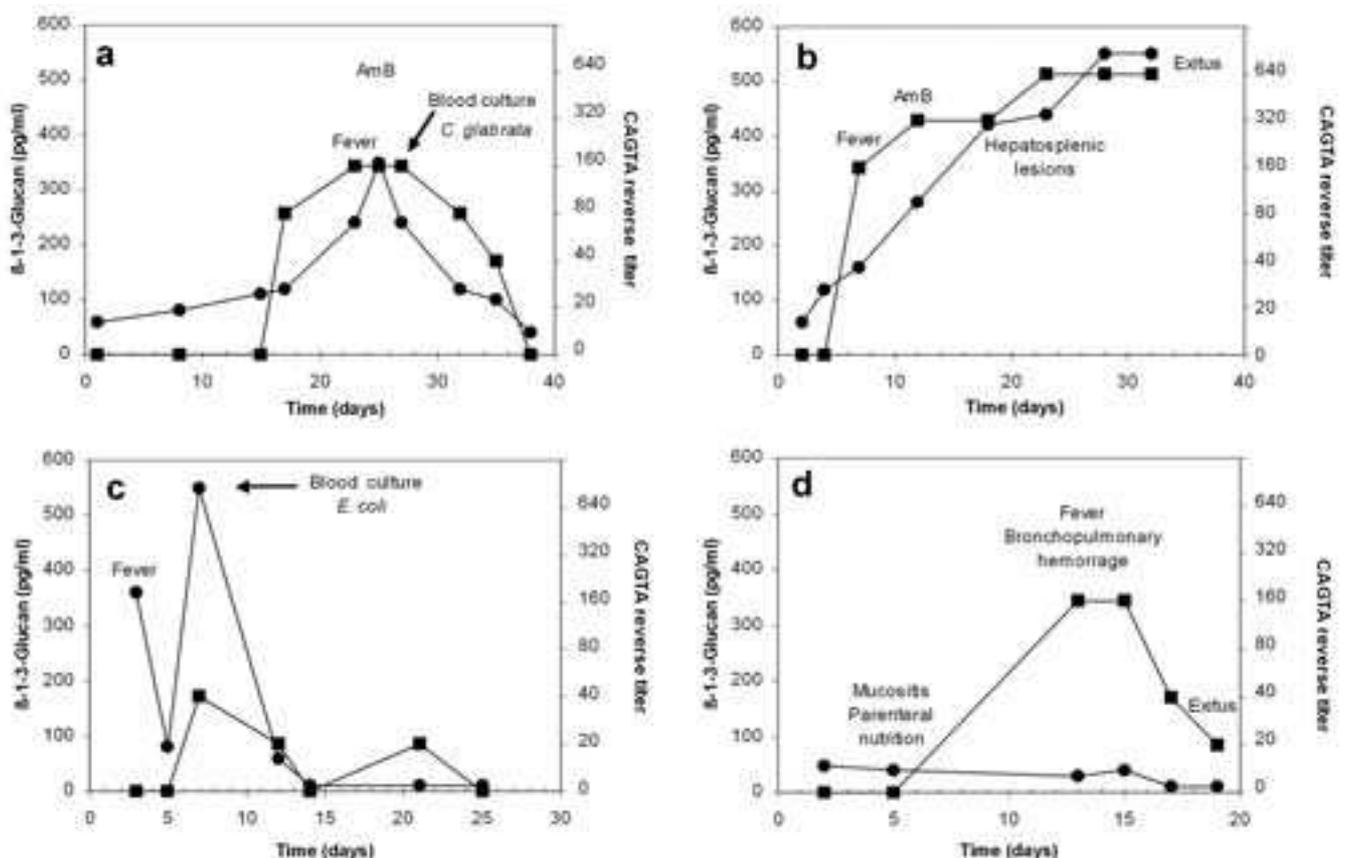


Figura 3. Evolución de los títulos de anticuerpos anti-micelio (n) y (1-3)- β -D-glucano (•) en un paciente con leucemia mieloide aguda y candidiasis invasora que respondió al tratamiento con anfotericina B (a) y en un paciente con leucemia linfocítica crónica y candidiasis invasora probable que no respondió al tratamiento con anfotericina B (b). Reacción positiva falsa para (1-3)- β -D-glucano en un paciente con mieloma múltiple sin candidiasis invasora (c). Reacción positiva falsa para anticuerpos anti-micelio en un paciente con linfoma no-Hodgkin sin candidiasis invasora (d). Abreviaturas: AmB, Anfotericina B. Reproducido de Pazos et al. [23].

didada por el ELISA Platelia *Candida* Ag presentó una sensibilidad del 75%, una especificidad del 97%, un valor predictivo positivo del 88,2% y un valor predictivo negativo del 92,8%. A pesar de la diferencia en sensibilidad entre ambas técnicas, los resultados no fueron estadísticamente significativos. La detección de manano de *Candida* por el Pastorex *Candida*-UELA presentó una sensibilidad del 25% y una especificidad del 100%.

Al comparar los pacientes que fueron positivos por PCR y ELISA, se observó que en el 45% de ellos, la PCR fue más precoz que el ELISA (6,3-2,2 días). En el resto de los pacientes ambas pruebas se positivizaron al mismo tiempo. Tres pacientes positivos por PCR y ELISA se recuperaron de la candidiasis sin tratamiento antifúngico y se consideraron falsos positivos, probablemente relacionados con una alta colonización por *Candida*.

La combinación de la PCR y el ELISA permitió detectar todas las candidiasis probables, por lo que estos autores recomiendan esta estrategia. Si se tiene en cuenta el coste de la prueba, el de los controles y el trabajo para realizar 10 determinaciones, el Látex-UELA fue el más barato (8,82 € por muestra), seguido del ELISA (10,29 € por muestra) y la PCR (14,7 € por muestra).

Conclusiones

En los últimos años se ha producido avances en el diagnóstico serológico de las micosis por hongos levaduriformes en la detección de anticuerpos frente a antígenos recombinantes y en la detección de (1-3)- β -D-glucano. Los estudios más recientes sugieren que será necesaria la combinación de dos técnicas que detecten antígeno, anticuerpos, (1-3)- β -D-glucano y ADN para optimizar este diagnóstico.

La investigación de los autores de este trabajo se ha financiado con las becas PI040776 (a AdP) y PI040556 (a JP) del Fondo de Investigación Sanitaria, de la Fundación Mutua Madrileña Automovilística (a AdP) y con una beca concedida por Pfizer, España (a AdP).

Bibliografía

- Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ and the Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7-14.
- Asensio A, Canton R, Vaque J, Rossello J, Arribas JL. 2002. Etiología de las infecciones hospitalarias en España (EPINE, 1990-1999). *Med Clin (Barc)* 2002; 118: 725-730.
- Bailey DA, Feldmann PJ, Bovey M, Gow NA, Brown AJ. The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J Bacteriol* 1996; 178: 5353-5360.
- Bar W, Hecker H. Diagnosis of systemic *Candida* infections in patients of the intensive care unit. Significance of serum antigens and antibodies. *Mycoses* 2002; 45: 22-28.
- Birse CE, Irwin MY, Fonzi WA, Sypherd PS. Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* 1993; 61: 3648-3655.
- Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45: 361-368.
- Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. *Am J Infect Control* 2002; 30: 458.
- 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.
- Ferrer C, Alio JL, Mulet ME, Rodríguez AE, Colom MF. Polymerase chain reaction and DNA typing for diagnosis of infectious crystalline keratopathy. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32: 2142-2145.
- 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.
- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1172-1177.
- Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet* 1998; 33: 451-459.
- 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.
- Lain A, Elguezal 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* Hwp1. *BMC Microbiol* 2007; 7: 35 (21Apr 2007).
- Lain 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.
- Maaroufi Y, Heymans C, de Bruyne JM, Duchateau V, Rodríguez-Villalobos H, Aoun M, Crokaert F. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3293-3298.
- Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 909-917.
- McGee DC, Gould MK. Preventing complications of central venous catheterization. *N Engl J Med* 2003; 348: 1123-1133.
- Moragues MD, Ortiz 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 Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 83-88.
- 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.
- 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.
- 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 (1-3)- β -D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 654-659.

23. Pazos C, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, del Palacio A. Diagnostic potential of (1,3)-beta-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.
24. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1-3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5957-5962.
25. 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.
26. 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.
27. Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 25-29.
28. Pontón J. El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 20-25.
29. Pontón J. Valor diagnóstico de la detección de antígenos y anticuerpos frente a *Candida* spp. *Medicina Intensiva* 1999; 23: 38-46.
30. Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG. Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol* 2000; 110: 273-284
31. 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.
32. 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.
33. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56 (Supl. 1): i5-i11.
34. Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 495-504.
35. Safdara A, Perlin DS, Armstrong A. Hematogenous infections due to *Candida parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 11-16.
36. 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.
37. Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M, Poulain D. Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of a- and b-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 164-171.
38. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 44-69.
39. 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.
40. Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 730-797.
41. 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.
42. Wey S B, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel R P. Risk factors for hospital-acquired candidemia. A matched case-control study. *Arch Intern Med* 1989; 149: 2349-2353.
43. 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.
44. 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: 864-870.