



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Formación médica continuada: infección fúngica invasora

Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora[☆]

Manuel Cuenca-Estrella

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 18 de enero de 2012

Aceptado el 19 de enero de 2012

On-line el 6 de marzo de 2012

Palabras clave:

Detección de biomarcadores

Diagnóstico precoz

Galactomanano

R E S U M E N

En los últimos años se han desarrollado varios métodos alternativos a las técnicas convencionales para la detección precoz de la enfermedad fúngica invasora (EFI). En este texto se revisa la utilidad de estos métodos en la práctica clínica y se analiza si pueden considerarse alternativas reales al examen microscópico y al cultivo microbiológico, si solo deben considerarse técnicas complementarias o si deben ser tomadas como técnicas en desarrollo alejadas del laboratorio clínico, disponibles únicamente en centros de referencia. El texto se divide en 3 secciones, ya que analiza por separado las infecciones por *Candida*, la aspergilosis y las micosis por especies emergentes y poco frecuentes.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Laboratory diagnosis of fungal infection diseases

A B S T R A C T

A number of newer diagnostic procedures have been developed over the last few years as alternatives to conventional microbiological methods to detect invasive fungal diseases (IFD). This text reviews the performance of alternative methods in clinical settings, and their accuracy compared with that of microscopical examination and microbiological cultures. Some newer techniques considered as complementary and experimental procedures are also reviewed. The text is divided into three sections, including *Candida* infections, aspergillosis and infections due to rare and emerging fungal species.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Biomarker detection

Early diagnosis

Galactomannan

Introducción

Las enfermedades fúngicas invasoras (EFI) tienen elevados porcentajes de mortalidad, ya que son complicaciones que aparecen en pacientes con mal estado general por su enfermedad de base y porque suelen detectarse cuando ya han causado lesiones macroscópicas extensas y cuadros invasores, por lo que es muy difícil que respondan al tratamiento antifúngico¹⁻³.

Por ello, la estrategia terapéutica más aceptada es pautar tratamiento profiláctico en pacientes con riesgo de EFI e iniciar terapia empírica cuando aparecen signos clínicos compatibles con infección, como neutropenia febril prolongada o signos de sepsis en enfermos críticos. Sin embargo, esta estrategia siempre ha tenido muchos detractores, ya que conlleva un uso inadecuado y excesivo de antifúngicos, lo que se relaciona con la aparición de efectos

tóxicos, el desarrollo de resistencias y un gasto farmacéutico elevado. En la última década han aparecido algunas innovaciones que están modificando esta estrategia. Estos cambios están relacionados con el diagnóstico y el tratamiento precoces de la EFI y reciben la denominación de terapia anticipada, término acuñado dentro de las infecciones por citomegalovirus en pacientes hematológicos. En el campo de las infecciones fúngicas el tratamiento anticipado hace referencia, en su mayor parte, a la detección precoz de la aspergilosis en enfermos hematológicos con inmunodepresión intensa gracias a la cuantificación de galactomanano^{4,5}.

En los últimos años se han desarrollado otras técnicas microbiológicas para detectar precozmente las micosis invasoras. Suelen agruparse bajo el término de técnicas alternativas al cultivo, ya que están basadas en la detección de componentes fúngicos². En este texto se revisa la utilidad de estos métodos en la práctica clínica y se analiza si pueden considerarse alternativas reales al examen microscópico y al cultivo microbiológico. El texto se divide en 3 secciones, ya que analiza por separado las infecciones por *Candida*, la aspergilosis y las micosis por especies emergentes y poco frecuentes.

[☆] Nota: sección acreditada por el SEAFORMEC. Consultar preguntas de cada artículo en: <http://www.elsevier.es/eimc/formacion>

Correo electrónico: mcuenca-estrella@isciii.es

Tabla 1

Volumen de sangre recomendado en la toma de hemocultivos según la edad y el peso del paciente

Pacientes	Volumen de sangre en hemocultivos*
Adultos	60 ml
Adultos <50 kg de peso	40 ml o 1 ml/kg de peso
Niños 12-36 kg	20 ml
Niños 2-12 kg	6-10 ml
Niños 2-6 kg	2-4 ml

*Hemocultivos: 3 venopunciones diferentes realizadas en 30 min y divididas en 6 alícuotas, 3 para botellas aerobias y 3 para anaerobias.

Diagnóstico de laboratorio de la candidiasis invasora

La candidiasis invasora es una infección profunda que suele afectar a varios órganos y que generalmente cursa con hemocultivos positivos, aunque los hemocultivos pueden ser negativos hasta en la mitad de los casos. La candidemia solo hace referencia a la presencia de levaduras del género *Candida* en hemocultivos, habitualmente en el curso de una candidiasis invasora, pero existen muchos casos en que la candidemia es el único signo de infección, particularmente en los enfermos en los que la candidemia se asocia a la presencia de un dispositivo intravenoso. La candidiasis crónica diseminada es un tipo de infección invasora descrita en enfermos neutropénicos que cursa con lesiones hepáticas y esplénicas y, frecuentemente, con hemocultivos negativos⁴.

Diagnóstico microbiológico convencional de la candidiasis invasora

Diagnóstico por hemocultivos

La técnica de referencia para el diagnóstico de la candidiasis invasora sigue siendo la toma de hemocultivos. De acuerdo con las recomendaciones, la toma de hemocultivos debe realizarse una vez al día mientras exista sospecha de infección. En adultos, debe obtenerse un volumen total diario de 60 ml de sangre, realizando 3 venopunciones de 20 ml en diferentes zonas anatómicas en un periodo de 30 min. Se deben inocular 3 frascos aerobios y 3 anaerobios e incubar al menos durante 7 días en sistemas automatizados validados para el diagnóstico clínico. Puede reducirse el volumen de las tomas en pacientes con condiciones especiales, como bajo peso o anemia. En niños, los volúmenes recomendados son menores y se presentan en la tabla 1. Algunos expertos recomiendan 2 únicas venopunciones y otras 4 por conjunto de hemocultivos, sin que existan evidencias sobre una menor o mayor rentabilidad⁶.

La sensibilidad de la técnica siguiendo estrictamente las recomendaciones del párrafo anterior es solo del 50-75%. En muchas ocasiones no es posible extraer los volúmenes recomendados, lo que tiene un efecto significativo en la fiabilidad diagnóstica de los hemocultivos. Esta técnica no debe considerarse de detección precoz, ya que se necesita que la infección esté avanzada para que los hemocultivos sean positivos, y además debe contarse el tiempo de incubación necesario para que se detecte crecimiento, que puede ser de varios días en algunas especies de *Candida*, como *C. glabrata*⁷. Por ello se están desarrollando métodos diagnósticos alternativos que se analizarán en próximos apartados.

Otro aspecto destacable es que no todas las levaduras que crecen en los hemocultivos deben considerarse como *Candida* spp. Según los últimos datos epidemiológicos, hasta el 5% de las levaduras obtenidas de hemocultivos pertenecen a otras especies, como *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* o *Saccharomyces*⁸⁻¹⁰.

Todas las levaduras aisladas en hemocultivos deben ser identificadas al nivel de especie, ya que existen diferencias probadas en cuanto al perfil de sensibilidad de las diferentes especies. Se deben utilizar medios de cultivo habituales para hongos y pueden emplearse medios diferenciales que ayudan a identificar

presuntivamente y distinguir entre las diferentes especies de *Candida*, por lo que se puede recomendar un tratamiento u otro hasta la identificación definitiva del patógeno. La identificación definitiva debe basarse en la morfología microscópica y en la realización de pruebas bioquímicas complementarias. Actualmente, algunos centros realizan la amplificación y/o secuenciación de ácidos nucleicos como técnicas de identificación definitiva o emplean metodologías novedosas como la basada en espectrofotometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization/time-of-flight mass spectrometer*). Estas técnicas no son necesarias para la identificación de las especies más habituales, pero sí pueden ayudar en el caso de los organismos poco frecuentes^{11,12}. Tienen la ventaja adicional de poder ser utilizadas directamente sobre los hemocultivos, sin necesidad de realizar subcultivos intermedios, lo que agiliza el diagnóstico^{4,13}.

Otro aspecto destacable son los estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Existe un consenso mayoritario por el que se recomienda realizar el estudio de sensibilidad a los antifúngicos en todas las cepas de *Candida* aisladas en infecciones profundas. Para ello pueden emplearse técnicas comerciales que hayan sido validadas clínicamente o los métodos de referencia del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) o del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). El estudio de sensibilidad es de especial utilidad en casos de enfermos expuestos con anterioridad a fármacos antifúngicos, en fracasos terapéuticos o en cepas pertenecientes a especies poco habituales de las que no existen muchos datos sobre perfil de resistencias^{14,15}.

Diagnóstico en otras muestras clínicas

En cuanto a los métodos de diagnóstico convencionales en otras muestras clínicas, como biopsias y exudados de líquidos estériles, deben hacerse las siguientes recomendaciones. La toma y el transporte de la muestra no requieren medidas específicas y se deben seguir los procedimientos habituales. Debe tomarse la mayor cantidad de muestra posible, ya que la sensibilidad de los exámenes microscópicos y de los cultivos disminuye cuando se procesan muestras pequeñas o de poco volumen. Las muestras tienen que ser enviadas al laboratorio con rapidez o han de conservarse refrigeradas si no son procesadas en menos de 1 h. Las que van a ser procesadas para citología o exámenes histopatológicos deben ser incluidas en los fijadores lo antes posible. Las muestras remitidas para examen en fresco y cultivo microbiológico deben ser procesadas asépticamente y nunca ser incluidas en fijadores. La visualización de levaduras en muestras estériles es indicativa de infección profunda. La utilización de contrastes (tinta china, tinta Parker o azul de lactofenol) y de tinciones con colorantes como las técnicas argentícas, la hematoxilina-eosina, el Giemsa, el azul de metileno y el PAS, aumentan la rentabilidad de la microscopía. También puede emplearse el microscopio de fluorescencia aplicando como contraste fluorescente el blanco de calcoflúor. Las biopsias tienen que deshacerse cuidadosamente y se debe utilizar un 10% de hidróxido de potasio, que ayuda a realizar este examen^{4,16}.

No obstante, la visión de estructuras fúngicas solo es posible cuando estas son muy abundantes en la muestra a analizar, lo que suele producirse cuando la infección está muy avanzada. Además, salvo excepciones, los exámenes microscópicos no sirven para identificar la especie causante de la infección, lo que se considera fundamental desde que existen diferentes alternativas terapéuticas y se conocen los distintos perfiles de sensibilidad de las especies fúngicas.

En cuanto a los estudios histopatológicos, tanto la citología como el examen de cortes histológicos ayudan a detectar la infección fúngica. En ocasiones puede ser el único método capaz de detectar la infección. Los cortes histológicos también pueden emplearse para realizar técnicas inmunohistoquímicas que permiten identificar las especies presentes en el tejido mediante la utilización de un

anticuerpo específico fluorescente que se liga a los tejidos infectados. Asimismo, también pueden utilizarse procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos, tras su extracción previa de los tejidos. Las técnicas moleculares podrían convertirse en las técnicas de referencia para la identificación de las especies en muestras tisulares. No obstante, no existen métodos estandarizados, y todos los trabajos publicados hasta la fecha incluyen pequeños estudios de casos, que no tenían un tamaño muestral representativo¹⁷⁻¹⁹.

Los cultivos deben realizarse en medios habituales y para hongos. En las muestras en las que pueda existir una infección polimicrobiana o flora bacteriana comensal deben emplearse medios selectivos, como el agar Sabouraud con antibióticos como cloranfenicol y gentamicina. También se recomienda la utilización de medios de cultivo diferenciales, sobre todo en muestras donde puedan existir varias especies de levaduras. Los medios diferenciales cromógenos permiten reconocer varias especies de levaduras por el color de la colonia. Estos medios son de gran utilidad para distinguir las infecciones mixtas, que según algunos estudios podrían alcanzar hasta el 30% de todas las micosis⁴.

Diagnóstico alternativo de la candidiasis invasora

En el caso de la candidiasis invasora, el desarrollo de técnicas alternativas al cultivo y a la microscopia se encuentra algo retrasado si lo comparamos con la aspergilosis o la criptococosis. A diferencia de la aspergilosis y otras infecciones por hongos filamentosos, la radiología tiene un papel muy reducido en el diagnóstico de la candidiasis, y las técnicas de detección de componentes fúngicos no tienen la misma aceptación que la cuantificación de galactomanano.

Sin embargo, en los últimos años se ha observado que es necesario disponer de técnicas de diagnóstico precoz de la candidiasis invasora, sobre todo en el enfermo crítico (tabla 2). En estos enfermos y ante la poca fiabilidad de los hemocultivos, la evaluación precoz del riesgo de candidiasis se hace mediante escalas o índices (scores), que incluyen la presencia de signos de infección en pacientes con riesgo de candidiasis más la colonización por levaduras. Cuando este índice está por encima de un valor, se inicia tratamiento empírico con antifúngicos. El valor predictivo positivo de estas escalas no supera el 20%. Por tanto, parece que se están tratando un gran número de enfermos que no lo necesitarían si se dispusiera de un método diagnóstico más preciso¹.

Detección de manano y de anticuerpo anti-manano

La detección combinada de manano y de anticuerpo anti-manano ha sido desarrollada como técnica específica para la detección de *Candida* spp. en suero. Hay un kit comercial disponible (Platelia Candida Antígeno Plus y Antibody Plus, Bio-Rad Laboratories). Se han realizado trabajos retrospectivos multicéntricos y varios estudios de cohortes, así como de casos y controles. En todos ellos, la técnica ha demostrado una gran fiabilidad para la detección de la candidemia, con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 85%. Se recomiendan hacer determinaciones seriadas (2 a la semana) en pacientes con riesgo, y de esta forma se adelanta la detección de la infección unos 6 días. La técnica tiene un 85% como valor predictivo negativo, por lo que puede ser muy útil para descartar la infección y ahorrar tratamientos innecesarios²⁰. Por todo ello, la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) recomienda en su guía sobre el diagnóstico y tratamiento de la candidiasis (en fase de publicación definitiva)²¹ la utilización de esta técnica diagnóstica en los laboratorios asistenciales para la detección de la candidemia. No existen datos sobre otras candidiasis invasoras, a excepción de la candidiasis crónica diseminada, donde un metaanálisis reciente indica que en este subgrupo de pacientes la sensibilidad de la técnica es del 86% y que detecta la infección 16 días antes que los hemocultivos²⁰.

Detección de anticuerpos antimicelio o anti tubos germinales

Otra técnica específica para la detección de *Candida* es la cuantificación de anticuerpos antimicelio o anti tubos germinales de *C. albicans* (CAGTA) en suero, que pese a su nombre es capaz de detectar anticuerpos frente a otras especies de *Candida*. Este método ha sido desarrollado en España y comercializado como *Candida albicans* IFA IgG® (Vircell). Los estudios preliminares realizados indican que tiene una sensibilidad del 84,4%, con un valor predictivo positivo del 96% y una especificidad del 94,7%. Recientemente se ha utilizado la técnica en un estudio piloto con enfermos críticos no neutropénicos de varios hospitales españoles, y ha demostrado que el aumento en los títulos de este anticuerpo se relaciona con la infección por *Candida*. Se está realizando un estudio multicéntrico con mayor número de enfermos que, muy probablemente, aportará datos definitivos sobre la utilidad de esta técnica²².

Detección de beta-D-glucano

Otras técnicas se basan en la detección del beta-D-glucano, componente de la pared fúngica que no es específico de especie. Puede emplearse en el diagnóstico de la candidiasis, de la aspergilosis y de otras EFL, por lo que se incluyó como criterio diagnóstico de la European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG)²³. En *Cryptococcus* spp., otros basidiomicetos y zigomicetos, este glucano parece que podría existir en cantidades muy bajas, lo que disminuiría la sensibilidad de la técnica.

Existen varias técnicas comercializadas para la detección de glucano en suero. En Europa y en América la más utilizada es el Fungitell (Associated of Cape Cod Incorporated). Se han publicado varios metaanálisis, que incluían estudios transversales, de cohortes y de casos y controles²⁴⁻²⁶. En todos ellos la sensibilidad media de la técnica supera el 70%, con una especificidad > 80% y valores predictivos negativos > 85%. La utilización de albúmina, gases, inmunoglobulinas y hemodiálisis se asocia a falsos positivos, y la neutropenia a falsos negativos. Por ello, se ha impuesto la idea de que esta técnica puede ser de utilidad en el enfermo crítico, ayudando a descartar la infección. Los datos disponibles en los estudios antes mencionados muestran que la sensibilidad de la cuantificación de beta-D-glucano en el caso concreto de la candidemia y otras candidiasis invasoras puede ser superior al 80%, con un valor predictivo negativo > 90% cuando se realizan determinaciones seriadas, adelantando en 7 días la detección por hemocultivos. De ahí que su uso asistencial ya esté recomendado en la guía de la ESCMID antes mencionada²¹. Este test no ha sido validado en población pediátrica.

Detección de ácidos nucleicos

Ante las limitaciones de las técnicas convencionales en el diagnóstico de las micosis profundas, la detección de ácidos nucleicos de los hongos en muestras clínicas siempre se ha considerado como una alternativa de gran potencial, sobre todo las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación de cantidades muy pequeñas de ADN. Sin embargo, la elevada sensibilidad teórica de las técnicas basadas en la PCR no se ha visto confirmada hasta la fecha en la práctica clínica, aunque cada vez existen más datos que parecen apoyar la utilización de estas técnicas en el diagnóstico de las micosis^{2,4}. Existe una técnica comercializada, SeptiFast (Roche Diagnostica), que permite detectar ADN de bacterias y de algunas especies fúngicas de *Candida* y de *Aspergillus*. Recientemente han visto la luz algunos estudios que indican que esta técnica podría ser eficaz en la detección de la candidemia^{27,28}. Por otra parte, existen decenas de trabajos sobre la utilidad de las técnicas diagnósticas basadas en la PCR para detectar las candidiasis invasoras. Por las características de esta metodología, su principal limitación es la falta de estandarización y las distintas metodologías empleadas. No obstante, un metaanálisis

Tabla 2
Resumen de las recomendaciones actuales sobre el diagnóstico alternativo al cultivo en las candidiasis invasoras

Tipo de candidiasis invasora	Técnica diagnóstica	Comentario
Candidemia	Detección de manano y anti-manano	Técnica útil como cribado cuando se realizan determinaciones séricas seriadas. Ayuda a descartar la infección
	Detección de anticuerpos frente a tubos germinales	Técnica en fase de validación. Podría ayudar a distinguir entre colonización e infección con muestras séricas
	Detección de beta-D-glucano	Técnica útil como cribado cuando se realizan determinaciones séricas seriadas. Ayuda a descartar la infección
Otras candidiasis invasoras	Detección de ácidos nucleicos	Técnica en fase de validación. Podría adelantar el diagnóstico de la infección en muestras de sangre o suero
	Detección de manano y anti-manano	No existen datos para hacer recomendaciones
	Detección de anticuerpos frente a tubos germinales	Técnica en fase de validación. Podría ayudar a distinguir entre colonización e infección
Candidiasis crónica diseminada	Detección de beta-D-glucano	Técnica útil como cribado cuando se realizan determinaciones séricas seriadas. Ayuda a descartar la infección
	Detección de ácidos nucleicos	Técnica en fase de validación. Podría detectar la infección tanto en suero/sangre como en muestras de otro origen
	Detección de nanano y anti-manano	Técnica útil para detectar la infección. Adelanta el diagnóstico de la infección
	Detección de anticuerpos frente a tubos germinales	Técnica en fase de validación
	Detección de beta-D-glucano	Técnica útil como cribado cuando se realizan determinaciones seriadas. Ayuda a descartar la infección
	Detección de ácidos nucleicos	Técnica en fase de validación. Podría detectar la infección tanto en muestras de sangre/suero como de otro origen

publicado en 2011 incluyó datos de 54 estudios diferentes con un total de 4.700 enfermos²⁹. La sensibilidad y la especificidad medias de estas técnicas en el diagnóstico de la candidemia fueron del 92 y del 95%. En el caso de enfermos críticos con sospecha de candidiasis invasora la sensibilidad de estas técnicas superó el 70%, mientras que los hemocultivos fueron positivos solo en el 38% de los casos. Además, otros trabajos han demostrado la precocidad diagnóstica de las técnicas moleculares frente a los cultivos tradicionales, ya que son capaces de detectar la infección 48 h antes (intervalo 12 h-8 días), lo que puede ser trascendental para instaurar un tratamiento precoz y aumentar la supervivencia de los enfermos³⁰.

Diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora

La aspergilosis invasora es una enfermedad que suele afectar principalmente a personas con graves enfermedades hematológicas sometidas a tratamientos inmunosupresores intensos y prolongados. La infección se produce por inhalación de conidias, por lo que la gran mayoría de los casos se inicia con una aspergilosis pulmonar que evoluciona hacia una infección diseminada fatal si no se recibe el tratamiento adecuado³. La detección precoz de la aspergilosis ha sido siempre una de las principales demandas diagnósticas. Por ello, se han desarrollado técnicas alternativas que se emplean rutinariamente en la actualidad, como se expondrá en los apartados siguientes (tabla 3).

Diagnóstico microbiológico convencional de la aspergilosis invasora

Las técnicas de diagnóstico convencional tienen una utilidad discreta en la detección de la aspergilosis invasora. *Aspergillus* spp. es un saprofito habitual del tracto respiratorio, por lo que su visualización y aislamiento en muestras respiratorias tienen un valor limitado. Por ello, en los últimos años se ha desarrollado la estrategia de la terapia anticipada basada en el diagnóstico radiológico y en la detección de componentes fúngicos^{2,23}.

Como ya se indicó anteriormente, el examen microscópico presenta una sensibilidad baja y no es una técnica de diagnóstico precoz. Su valor aumenta cuando se toman muestras de tejidos, que en el caso de la aspergilosis es una biopsia pulmonar. Las tinciones y técnicas microscópicas recomendadas en el apartado de la candidiasis son las que deben emplearse en la aspergilosis. En

ocasiones, los estudios histopatológicos son los únicos que permiten detectar una infección invasora, ya que es necesario ver que los filamentos y estructuras fúngicas están invadiendo los tejidos. Debe indicarse que los exámenes microscópicos no pueden identificar la especie causante ya que solo indican si la infección está causada por levaduras o por hongos miceliales. Además, dentro de estas últimas se pueden distinguir entre la hialohifomicosis, la feohifomicosis y la zigomicosis. Las hialohifomicosis, como la aspergilosis, muestran hifas finas, hialinas, septadas y con ramificaciones en ángulo agudo. Las feohifomicosis tienen filamentos de paredes gruesas con pigmentos de color oscuro. Los zigomicetos se caracterizan por presentar hifas anchas, irregulares, hialinas, sin septos y con ramificaciones en ángulo abierto (45-90°)^{31,32}.

Las consideraciones sobre toma y transporte de muestras, así como sobre los medios de cultivo, son muy similares a las expuestas anteriormente. Es muy importante evaluar con detenimiento la presencia de *Aspergillus* u otros hongos en cultivos, incluso en el caso de muestras consideradas no estériles. Los hongos miceliales son contaminantes habituales de laboratorio y forman parte de la flora saprofitas del ser humano, lo que disminuye la especificidad de los cultivos. Las levaduras no se consideran contaminantes de laboratorio, aunque sí forman parte de la flora de la piel y las mucosas. No obstante, antes de descartar un hongo como contaminante o flora saprofitas se debería tomar en consideración si el enfermo tiene factores de riesgo de micosis y si se han cultivado hongos en varias muestras del paciente.

Diagnóstico alternativo de la aspergilosis

Detección de galactomanano

La cuantificación de galactomanano se ha convertido en la principal innovación diagnóstica de la última década dentro del campo de la micología médica. El galactomanano es un componente de la pared celular de *Aspergillus* spp., aunque está presente en otras especies fúngicas en pequeñas cantidades. La detección de galactomanano se ha comercializado mediante un test de ELISA (Platelia *Aspergillus*, Bio-Rad) cuya principal aportación es su utilidad en el diagnóstico precoz de esta infección en pacientes oncohematológicos en riesgo de aspergilosis, en conjunción con la tomografía de alta resolución. La cuantificación de galactomanano es un criterio EORTC/MSG para el diagnóstico de aspergilosis probable^{5,23}.

Tabla 3

Resumen de las recomendaciones actuales sobre el diagnóstico alternativo al cultivo en la aspergilosis invasora

Técnica diagnóstica	Tipo de muestra	Comentario
Detección de galactomanano	Suero	Técnica útil como cribado cuando se realizan determinaciones séricas seriadas en pacientes hematológicos de alto riesgo Podría disminuir su sensibilidad en pacientes en profilaxis con itraconazol, posaconazol o voriconazol Es útil también para el seguimiento de la respuesta
	Lavado broncoalveolar LCR	Técnica útil para diagnosticar la infección Técnica útil para diagnosticar la infección
Detección de beta-D-glucano	Suero	Técnica útil como cribado cuando se realizan determinaciones séricas seriadas Podría ser menos sensible en pacientes neutropénicos No existen datos para hacer recomendaciones
	Otras muestras	Técnica en fase de validación
Detección de ácidos nucleicos	Suero	Podría ser útil como cribado cuando se realizan determinaciones séricas seriadas en pacientes hematológicos de alto riesgo Podría adelantar el diagnóstico de la infección Recomendaciones similares a las del suero
	Sangre	Técnica en fase de validación
	Otras muestras	Podría ser útil para detectar la infección e identificar la especie causante

La cuantificación de galactomanano como técnica de diagnóstico precoz se considera un método de cribado. Por eso, se deben realizar determinaciones seriadas en suero en enfermos con riesgo de infección. Se aconsejan 2 a la semana, ya que así se incrementan su sensibilidad y su valor predictivo negativo. Los puntos de corte para considerar un resultado positivo son un índice por encima de 0,7 en una única muestra o por encima de 0,5 en 2 muestras consecutivas³³.

En los últimos años se han publicado varios metaanálisis que recogen la experiencia publicada con esta técnica. Los porcentajes medios de sensibilidad y especificidad son > 70 y > 85%, respectivamente. La sensibilidad supera el 80% si se analizan solo los enfermos sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos, siendo aún mayor en trasplantes alogénicos (> 85%). Sin embargo, la sensibilidad desciende significativamente en enfermos no neutropénicos, por lo que no se recomienda como técnica de cribado en otros grupos de enfermos. En pacientes pediátricos existen menos estudios, aunque también es útil en enfermos de alto riesgo, si bien varios trabajos han destacado que esta técnica tiene muchos falsos positivos cuando se realiza en niños^{5,34}.

No obstante, otros autores han puesto en duda la fiabilidad de la detección sérica de este antígeno incluso en enfermos hematológicos. En primer lugar, la administración previa de antifúngicos, particularmente la profilaxis con itraconazol, posaconazol o voriconazol, parece disminuir la sensibilidad de la prueba en más de un 30%. Debe recordarse que la profilaxis antifúngica es una práctica muy extendida y recomendada en todas las guías terapéuticas, especialmente en pacientes con alto riesgo de aspergilosis, que es donde la cuantificación de galactomanano ha demostrado su mayor utilidad. Por tanto, la fiabilidad diagnóstica de las determinaciones seriadas ha sido puesta en duda en caso de utilizar profilaxis antifúngica. El descenso en la sensibilidad reduce la eficacia de la técnica como cribado^{2,5}.

Existen también muchas comunicaciones sobre falsos positivos asociadas al uso de betalactámicos, particularmente piperacilina/tazobactam³⁵, fármaco que se utiliza con frecuencia en los enfermos hematológicos. Otra posible causa de falsos positivos es la contaminación con conidias de *Aspergillus*, en la extracción o en la manipulación de la muestra, y la reactividad cruzada con otras especies fúngicas, inmunoglobulinas, hemoderivados e inmunosupresores como la ciclofosfamida³⁴.

Ante las dudas expuestas sobre la capacidad de esta técnica como medio de cribado en enfermos con profilaxis, algunos expertos creen que no debería emplearse de este modo, sino como un test diagnóstico en enfermos con signos de infección y, si es posible, no en suero sino en el lavado broncoalveolar. Esto ya ha demostrado su utilidad en otros grupos de enfermos. En pacientes no

hematológicos con aspergilosis, como los pacientes críticos corticodependientes, la sensibilidad de la detección de galactomanano en suero es < 50%, pero en el lavado puede superar el 90%³⁶. Recientemente se han publicado datos sobre la utilización de la cuantificación de galactomanano en lavados broncoalveolares en enfermos hematológicos³⁷. Con un *cut-off* de 1, la sensibilidad de la técnica supera el 90%, con un valor predictivo positivo del 95%. La cuantificación de galactomanano en esta muestra respiratoria se está convirtiendo en una prueba de gran utilidad diagnóstica. Desafortunadamente, no tiene la misma fiabilidad cuando se realiza en otras secreciones respiratorias más accesibles, como esputo, secreciones bronquiales o lavados nasofaríngeos.

En cuanto a su utilización para realizar el seguimiento de la respuesta al tratamiento, no se han publicado estudios sólidos, aunque existen algunas evidencias. En enfermos hematológicos diagnosticados de aspergilosis invasora y en tratamiento antifúngico, un índice de galactomanano por encima de 1 en 2 muestras consecutivas se considera un indicio de fracaso terapéutico y los expertos recomiendan pautar un tratamiento de rescate³⁸.

En 2009, la 3th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL3) elaboró un consenso sobre el tratamiento y el diagnóstico de la aspergilosis en pacientes hematológicos. Sus recomendaciones finales sobre la utilización de galactomanano indican que esta técnica debe emplearse de forma rutinaria como cribado, en conjunción con la tomografía de alta resolución, en pacientes neutropénicos adultos en quimioterapia intensiva por leucemia o que han recibido un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. Se deben realizar determinaciones séricas seriadas cada 3 o 4 días. Las publicadas por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) en 2011 incluyen recomendaciones similares. Ambos consensos comentan el efecto negativo de la profilaxis sobre la capacidad de diagnóstico precoz de la técnica. Los expertos también recomiendan, aunque con menor grado de evidencia, realizar cuantificaciones de galactomanano en el lavado broncoalveolar y el líquido cefalorraquídeo (LCR) cuando estas muestras estén disponibles, tanto en enfermos neutropénicos como no neutropénicos^{2,4}.

Detección de beta-D-glucano

En cuanto a otras técnicas alternativas para el diagnóstico de la aspergilosis, también se han visto progresos en los últimos años. Como se comentó en secciones anteriores, la cuantificación de beta-D-glucano se considera un criterio diagnóstico de EFI. Es un método de detección panfúngico que, en el caso de la aspergilosis, ha mostrado cifras de sensibilidad por encima del 60%. Hay algunas dudas sobre su utilidad como técnica de diagnóstico precoz en pacientes neutropénicos. Estas dudas, unidas a su poca implantación en

los laboratorios asistenciales, han hecho que haya poca experiencia sobre esta técnica. Actualmente se considera un método que ayudaría a descartar infecciones por *Candida* en pacientes críticos, y es en el que se están realizando los principales estudios^{24,39}.

Detección de ácidos nucleicos

En cuanto a la detección de ácidos nucleicos, la mayor parte de los métodos basados en la PCR para intentar diagnosticar EFI se han desarrollado para el diagnóstico de la aspergilosis. Un metaanálisis analizó un total de 16 estudios y 1.620 pacientes, publicados hasta el año 2008, en los que se utilizaron diferentes técnicas de PCR para detectar ADN de *Aspergillus* en muestras de sangre, suero y plasma⁴⁰. Los autores resaltaron la falta de estandarización, las contaminaciones frecuentes y la escasa cantidad de ADN de *Aspergillus* que puede encontrarse en las muestras hematológicas. No obstante, el metaanálisis demostró que la detección de ADN puede ser de utilidad. Los resultados finales indicaron que un resultado positivo con la técnica de PCR tuvo un 88% de sensibilidad y un 75% de especificidad en el diagnóstico de la aspergilosis. Además, cuando se hicieron determinaciones seriadas, 2 o más PCR positivas consecutivas se relacionaban con un riesgo de aspergilosis 6 veces superior.

En los últimos años se están llevando a cabo diferentes estudios para acercar estas técnicas al diagnóstico clínico. La falta de reproducibilidad se está intentando superar mediante la estandarización y el control de calidad de los procedimientos. Uno de los principales avances ha sido la aparición de los métodos cuantitativos, entre los que destacan las técnicas de PCR cuantitativa o PCR en tiempo real, que están permitiendo automatizar los procesos de extracción y establecer unos requisitos mínimos para realizar estas técnicas⁴¹. Además, la International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM) patrocina un ensayo multicéntrico mundial para estandarizar la detección de ADN de *Aspergillus* mediante técnicas basadas en la PCR. Hasta la fecha se han estandarizado procedimientos para la detección de ADN en sangre y suero mediante PCR en tiempo real, como la recomendación de que las técnicas incluyan un control interno para descartar la inhibición⁴². También se ha observado que la rentabilidad en suero es similar a la de la sangre, por lo que se ha indicado que estas técnicas pueden hacerse en suero, lo que resulta más conveniente para los laboratorios clínicos⁴³.

Muchos expertos creen que lo que debe realizarse son determinaciones seriadas de ADN de *Aspergillus* en muestras de suero. Esta estrategia es similar a la que se sigue con el galactomanano y el beta-D-glucano, y pretende aumentar la sensibilidad y la capacidad de detectar precozmente la infección, convirtiéndose en una técnica de cribado. En los últimos años se han publicado algunos trabajos que demuestran la eficacia diagnóstica de las determinaciones seriadas. En estos, la sensibilidad de las determinaciones seriadas supera el 75% y los valores predictivos negativos se acercan al 100%, lo que permitiría descartar la infección con fiabilidad^{44,45}. Otros autores han comunicado resultados desfavorables sobre estas técnicas, pero debe indicarse que en estos trabajos se incluyeron enfermos en profilaxis y con terapia empírica, lo que probablemente influyó en la sensibilidad de la técnica^{46,47}. Otros trabajos han analizado retrospectivamente muestras que tenían conservadas extraídas de enfermos hematológicos con alto riesgo de aspergilosis y han comunicado que la mortalidad de los enfermos con PCR positivas fue significativamente superior a la de los pacientes con PCR negativas⁴⁸.

Un aspecto relacionado con la utilización de la PCR como técnica de cribado es su impacto sobre el consumo excesivo de antifúngicos al reducir su utilización empírica. Algún estudio ya ha mostrado este efecto positivo en este sentido, y se están realizando ensayos clínicos. Uno de ellos ya ha sido publicado, y en él se evaluaron 2 estrategias en el manejo del enfermo hematológico: la empírica

y la terapia anticipada basada en las determinaciones seriadas de ADN mediante PCR⁴⁹. No se encontraron claras diferencias entre ambas estrategias, aunque en el grupo de la PCR la mortalidad al día 30 de seguimiento fue significativamente menor que en el grupo del tratamiento empírico (1,5% vs. 6,3%). En este estudio, el consumo de antifúngico fue superior en el grupo de la PCR (57% vs. 37%), lo que contradice el paradigma de la estrategia basada en el diagnóstico y que rechaza el empirismo.

Otro planteamiento es la utilización de las técnicas de PCR como tests diagnósticos en muestras como secreciones respiratorias y en biopsias de pulmón o de otros tejidos. Algunos trabajos han demostrado que la PCR puede ser muy útil para detectar *Aspergillus* en tejidos y en los lavados broncoalveolares, e incluso existe un método comercial, MycassayTM (Myconostica), que ha mostrado una sensibilidad apreciable en lavados broncoalveolares^{50,51}.

Otro aspecto a tener en cuenta sobre la rentabilidad de las técnicas de PCR es su utilización combinada con la cuantificación de otros componentes fúngicos o con la tomografía de alta resolución. Los estudios que han analizado la utilización combinada del galactomanano y de la PCR han demostrado que se detecta el 100% de los casos de aspergilosis, tanto en muestras hematológicas como en lavado broncoalveolar^{50,52}.

En cuanto a la precocidad diagnóstica de las determinaciones seriadas de ADN, no existen datos definitivos, pero podrían adelantarse el diagnóstico de la infección varias semanas, al detectar enfermos en estadios iniciales de la infección o con el tracto respiratorio muy colonizado^{53,54}. Esto podría conllevar un aumento del consumo de antifúngicos, lo que debe tomarse en consideración si las estrategias basadas en el diagnóstico no consiguen aumentar la supervivencia de los enfermos.

Los últimos consensos de la EORTC/MSG, de la ECIL y de la SEIMC no han incluido las técnicas basadas en la PCR como criterio diagnóstico de la infección. Debe considerarse como una técnica complementaria, útil en casos seleccionados, que se utiliza en algunos laboratorios de referencia, y esperar a la publicación de los estudios que están en marcha.

Diagnóstico de laboratorio de otras micosis invasoras

Uno de los aspectos que despierta mayor interés en el campo de la micología médica son las micosis invasoras por especies poco habituales y que reciben el nombre de especies emergentes. Es difícil estimar su frecuencia, pero existen algunos datos. El 5% de las fungemias están causadas por especies que no son *Candida*, y hasta el 20% de las infecciones pulmonares por hongos no están causadas por *Aspergillus*. Por ello, ante la disponibilidad de diferentes antifúngicos es necesario que los hongos se identifiquen al nivel de especie. A este respecto puede ser fundamental la aplicación de procedimientos basados en la detección molecular de ADN fúngico, especialmente en muestras de tejidos donde se observa invasión por estructuras fúngicas^{2,55}.

Las micosis emergentes en España tienen 2 vertientes. Por un lado, la aparición de nuevas especies fúngicas oportunistas, y por otro, el aumento de las micosis endémicas primarias, asociado a la inmigración y a los viajes a zonas endémicas⁵⁶. Se remite al lector a las recomendaciones de la SEIMC recientemente publicadas sobre estas infecciones, ya que en este texto no puede incluirse una revisión en profundidad sobre ellas^{1,3,4}.

En cuanto al diagnóstico convencional, pueden hacerse recomendaciones similares a las recogidas en los apartados de *Candida* y *Aspergillus*. Muchas de estas especies son de crecimiento lento y difíciles de cultivar, por lo que se aconseja la utilización de medios de cultivo dispensados en tubo en vez de en placa, ya que se evita la contaminación y la desecación del agar. Además, deben sembrarse en tubo las muestras procedentes de enfermos en los que

se sospeche la presencia de *Histoplasma* o de otro patógeno endémico, ya que el cultivo en tubo disminuye el riesgo de inhalación accidental en el laboratorio. Es importante recordar que los cultivos sospechosos de contener un hongo patógeno primario deben manejarse en instalaciones que cumplan las condiciones de bioseguridad GR-3⁵⁶.

En cuanto a las técnicas alternativas, en este apartado debe incluirse el método de diagnóstico que quizá sea el más fiable en la detección de una infección oportunista: la detección del antígeno capsular de *Cryptococcus*. Desarrollado hace 50 años, se emplea en muestras de LCR, hematológicas, secreciones respiratorias y orina. En enfermos VIH+ con criptococosis, la sensibilidad de estas técnicas es cercana al 100% en LCR y alrededor del 95% en sangre. La técnica también puede emplearse para evaluar la evolución de los enfermos. En enfermos inmunodeprimidos no VIH+, la sensibilidad de la detección antigénica desciende al 75%¹⁶.

En el caso de otras infecciones fúngicas, no se ha conseguido desarrollar métodos de detección tan eficaces como el de la criptococosis. La detección de beta-D-glucano, al ser panfúngica, podría emplearse para detectar algunas de estas infecciones, pero no existen datos publicados, a excepción de la neumonía por *Pneumocystis jiroveci*. En estas, la sensibilidad de la técnicas se sitúa por encima del 95%, con concentraciones antigénicas séricas muy por encima de las observadas en otras micosis (> 200 pg/ml)²⁶.

Como se indicó anteriormente, las técnicas moleculares podrían ayudar a detectar las micosis poco frecuentes. Se han realizado trabajos con técnicas de PCR para especies de zigomicetos, *Scedosporium*, *Pneumocystis jiroveci* y hongos endémicos^{2,56-60}. Se han utilizado tanto en muestras de sangre y suero como en tejidos. Los resultados son prometedores, pero deben realizarse estudios más amplios con métodos estandarizados. En cuanto a las micosis endémicas, se han publicado 128 casos de histoplasmosis y 21 de paracoccidioidomicosis en España en las últimas décadas. En algunos casos se han utilizado técnicas moleculares de diagnóstico. Su eficacia es muy buena en muestras respiratorias y biopsias, y algo inferior (70-80%) en muestras hematológicas, sobre todo en pacientes con infecciones localizadas.

En el caso de la neumocistosis, se han publicado estudios en los que es posible distinguir la colonización de la infección mediante técnicas de PCR cuantitativa⁶¹. En pacientes VIH+, la sensibilidad y la especificidad de estas pruebas superan el 95%. En enfermos no VIH, la sensibilidad es algo inferior, con valores predictivos positivos del 50% y negativos del 98%.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Aguado JM, Ruiz-Camps I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vazquez L, et al. Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:345-61.
- Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Floerl C, Racil Z, Richardson M, Rogers TR. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66 Suppl 1:i15-24.
- Fortun J, Carratala J, Gavaldaí J, Lizaolaín M, Salavert M, de la Camara R, et al. Recomendaciones sobre el tratamiento de la enfermedad fúngica invasiva por *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:435-54.
- Ayats J, Martín-Mazuelos E, Peman J, Quindos G, Sanchez F, García-Rodríguez J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:39.e1-15.
- Leefflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, Bijlmer HA, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;4:CD007394.
- Baron EJ, Weinstein MP, Dunne Jr WM, Yagupsky P, Welch DF, Wilson DM, Cumitech 1C. Cumulative techniques and procedure in clinical microbiology. En: *Blood Cultures IV*. Washington: ASM Press; 2005.
- Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fuursted K, Johansen HK, Kjeldgaard P, et al. National Surveillance of Fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol.* 2011;49:325-34.
- Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1829-35.
- Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis.* 2009;48:1695-703.
- Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:317-22.
- Cendejas-Bueno E, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1895-9.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Muller E, Horre R, Maier T, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2912-7.
- Gurgui M, Cuenca-Estrella M. Current status of invasive fungal infections. New diagnostic techniques and antifungal agents. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26 Suppl 14:1-6.
- Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, et al. Comparison of the VITEK 2 Antifungal Susceptibility System with the CLSI and the EUCAST Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre Yeast-One and the Etest Techniques for the Detection in Vitro of Antifungal Resistance in Yeasts. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1782-6.
- Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8:267-76.
- Peman J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC, editores. Asociación Española de Micología. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2001.
- Kaufman L. Immunohistologic diagnosis of systemic mycoses: an update. *Eur J Epidemiol.* 1992;8:377-82.
- Lischewski A, Amann RI, Harmsen D, Merkert H, Hacker J, Morschhoener J. Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent in situ hybridization with an 18S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Microbiology.* 1996;142:2731-40.
- Munoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME, et al. Improving Molecular Detection of Fungal DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues: Comparison of Five Tissue DNA Extraction Methods Using Panfungal PCR. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2147-53.
- Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C, The Third European Conference on Infections in Leukemia Group. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care.* 2010;14:R222.
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. The ESCMID diagnostic & management guideline for Candida diseases 2011 [consultado 17 Ener 2012]. Disponible en: <http://www.escmid.org/escmid.br.library/online.lecture.library/eccmid/21st.eccmid27th.icc.2011.milan/recorded.sessions.2011/>
- Peman J, Zaragoza R, Quindos G, Alkorta M, Cuetara M, Camarena J, et al. Clinical factors associated with a *Candida albicans* Germ Tube Antibody positive test in Intensive Care Unit patients. *BMC Infectious Diseases.* 2011;11:60.
- de Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1813-21.
- Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. Beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2011;52:750-70.
- Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic performance of the (1->3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1650-9.
- Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-d-Glucan for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2012;50:7-15.
- Lamoth F, Jaton K, Prod'homme G, Senn L, Bille J, Calandra T, et al. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3510-6.
- Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2252-8.
- Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2011;49:665-70.

30. Lau A, Halliday C, Chen SC, Playford EG, Stanley K, Sorrell TC. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J Clin Microbiol.* 2010;48:811–6.
31. Lass-Flörl C, Resch G, Nachbaur D, Mayr A, Gastl G, Auberger J, et al. The value of computed tomography-guided percutaneous lung biopsy for diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2007;45:e101–4.
32. Lass-Flörl C. Zygomycosis: conventional laboratory diagnosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15 Suppl 5:60–5.
33. Maertens J, Buve K, Theunissen K, Meersseman W, Verbeke E, Verhoef G, et al. Galactomannan serves as a surrogate endpoint for outcome of pulmonary invasive aspergillosis in neutropenic hematology patients. *Cancer.* 2009;115:355–62.
34. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1417–27.
35. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT, et al. False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis.* 2004;38:913–6.
36. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:27–34.
37. Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1688–93.
38. Miceli MH, Graziutti ML, Woods G, Zhao W, Kocoglu MH, Barlogie B, et al. Strong correlation between serum *Aspergillus* galactomannan index and outcome of aspergillosis in patients with hematological cancer: clinical and research implications. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1412–22.
39. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Weinbergerova B, Buresova L, Toskova M, et al. Difficulties in using 1,3-beta-D glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal diseases in patients with hematological malignancies – high frequency of false positive results and their analysis. *J Med Microbiol.* 2010;59 Pt 9:1016–22.
40. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:89–96.
41. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55:611–22.
42. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B, et al. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1231–40.
43. Bernal-Martinez L, Gago S, Buitrago MJ, Gomez-Lopez A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Analysis of performance of a PCR-based assay to detect DNA of *Aspergillus fumigatus* in whole blood and serum: a comparative study with clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3596–9.
44. Barnes RA, White PL, Bygrave C, Evans N, Healy B, Kell J. Clinical impact of enhanced diagnosis of invasive fungal disease in high-risk haematology and stem cell transplant patients. *J Clin Pathol.* 2009;62:64–9.
45. Cuenca-Estrella M, Meije Y, Diaz-Pedroche C, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, et al. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 2009;47:379–84.
46. Armenian SH, Nash KA, Kapoor N, Franklin JL, Gaynon PS, Ross LA, et al. Prospective monitoring for invasive aspergillosis using galactomannan and polymerase chain reaction in high risk pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2009;31:920–6.
47. Blennow O, Remberger M, Klingspor L, Omazic B, Fransson K, Ljungman P, et al. Randomized PCR-based therapy and risk factors for invasive fungal infection following reduced-intensity conditioning and hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:1710–8.
48. Hummel M, Spiess B, Cornely OA, Dittmer M, Marz H, Buchheidt D. *Aspergillus* PCR testing: results from a prospective PCR study within the AmBiLoad trial. *Eur J Haematol.* 2010;85:164–9.
49. Hebart H, Klingspor L, Klingebiel T, Loeffler J, Tollemar J, Ljungman P, et al. A prospective randomized controlled trial comparing PCR-based and empirical treatment with liposomal amphotericin B in patients after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:553–61.
50. Torelli R, Sanguinetti M, Moody A, Pagano L, Caira M, De Carolis E, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2011;49:4273–8.
51. Rickerts V, Mousset S, Lambrecht E, Tintelnot K, Schwerdtfeger R, Presterl E, et al. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin Infect Dis.* 2007;44:1078–83.
52. Khot PD, Ko DL, Hackman RC, Fredricks DN. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infect Dis.* 2008;8:73.
53. Donnelly JP. Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go. *Clin Infect Dis.* 2006;42:487–9.
54. Klingspor L, Loeffler J. *Aspergillus* PCR formidable challenges and progress. *Med Mycol.* 2009;47 Suppl 1:S241–7.
55. Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzalez GM, et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol.* 2005;58:1180–4.
56. Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. *J Travel Med.* 2011;18:26–33.
57. Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of invasive infection caused by *Fusarium solani* and non-*Fusarium solani* species using a duplex quantitative PCR-based assay in a murine model of fusariosis. *Med Mycol.* 2011;1–6.
58. Castelli MV, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Development and validation of a quantitative PCR assay for diagnosis of scedosporiosis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3412–6.
59. Dannaoui E, Schwarz P, Slany M, Loeffler J, Jorde AT, Cuenca-Estrella M, et al. Molecular detection and identification of *Zygomycetes* species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis – A collaborative ESCMID Fungal Infection Study Group (EFISG) evaluation. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2043–6.
60. Kasai M, Harrington SM, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene R, Beveridge MG, et al. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3690–702.
61. Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, Evans HE, Morris-Jones S, Gant V, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax.* 2008;63:154–9.