



## Artículo especial

# Recomendaciones para el diagnóstico de la candidemia en América Latina<sup>☆</sup>

Arnaldo Lopes Colombo<sup>a,m,\*</sup>, Jorge Alberto Cortes<sup>b,m</sup>, Jeannete Zurita<sup>c,m</sup>, Manuel Guzman-Blanco<sup>d,m</sup>, Tito Alvarado Matute<sup>e,m</sup>, Flavio de Queiroz Telles<sup>f,m</sup>, María E. Santolaya<sup>g,m</sup>, Iris Nora Tiraboschi<sup>h,m</sup>, Juan Echevarría<sup>i,m</sup>, Jose Sifuentes<sup>j,m</sup>, Luis Thompson-Moya<sup>k,m</sup> y Marcio Nucci<sup>l,m</sup>

<sup>a</sup> Federal University of São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>b</sup> Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

<sup>c</sup> Hospital Vozandes Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador

<sup>d</sup> Hospital Privado Centro Médico de Caracas, Caracas, Venezuela

<sup>e</sup> Hospital Escuela, Tegucigalpa, Honduras

<sup>f</sup> Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil

<sup>g</sup> Hospital Luis Calvo Mackenna, Universidad de Chile, Santiago, Chile

<sup>h</sup> Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

<sup>i</sup> Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

<sup>j</sup> National Institute of Medical Sciences and Nutrition Tlalpan, Tlalpan, México

<sup>k</sup> Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile

<sup>l</sup> Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>m</sup> Latin America Invasive Mycosis Network

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

### Historia del artículo:

Recibido el 26 de marzo de 2013

Aceptado el 16 de mayo de 2013

On-line el 10 de junio de 2013

### Palabras clave:

Recomendaciones

Candidemia

Diagnóstico

América Latina

## R E S U M E N

La candidemia es una de las micosis oportunistas más frecuentes en todo el mundo. El escaso número de estudios epidemiológicos llevados a cabo en América Latina indica que las tasas de incidencia en esta región son mayores que las descritas en el hemisferio norte. A menudo el diagnóstico de la infección se establece tardíamente, lo que afecta al inicio del tratamiento antimicótico. Por esta razón, para el diagnóstico y el manejo de la candidemia está justificada una estrategia más científica, basada en parámetros específicos.

*Recomendaciones para el diagnóstico y manejo de la candidemia* constituye una serie de artículos preparados por miembros del grupo Latin America Invasive Mycosis Network. Su objetivo es proporcionar las mejores evidencias disponibles para el diagnóstico y el manejo de la candidemia.

El presente artículo, *Recomendaciones para el diagnóstico de la candidemia en América Latina*, ha sido redactado con el objetivo de brindar asesoramiento a los profesionales de la salud en lo referente al diagnóstico de la candidemia en pacientes que la padecen o están en riesgo de padecerla.

Mediante la base de datos PubMed se emprendió una búsqueda informatizada de los estudios publicados. Los miembros del grupo revisaron y analizaron exhaustivamente los datos. El grupo también se reunió en 2 ocasiones para proponer preguntas, abordar los puntos de vista conflictivos y deliberar sobre las recomendaciones terapéuticas.

*Recomendaciones para el diagnóstico de la candidemia en América Latina* incluye diversas recomendaciones sobre aspectos relacionados con los métodos diagnósticos para la detección de la candidemia, la identificación de las especies de *Candida* y las pruebas de sensibilidad antifúngica. Se expone también la disponibilidad de los métodos, sus costes y el marco en el que se aplican los tratamientos.

Este manuscrito es el primero de los artículos de esta serie dedicada al diagnóstico y tratamiento de las candidiasis invasoras. Otras publicaciones de esta serie son *Recomendaciones para el diagnóstico de la candidemia en adultos en América Latina*, *Recomendaciones para el manejo de la candidemia en niños en América Latina*, y *Recomendaciones para el manejo de la candidemia en neonatos en América Latina*.

Este artículo está publicado en inglés en este mismo número. Puede encontrarlo en <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.008>

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Véase contenido relacionado en DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.008>

<sup>☆</sup> Cómo citar este artículo: Colombo AL, et al. Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America. Rev Iberoam Micol. 2013;30:150–7.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [colomboal@terra.com.br](mailto:colomboal@terra.com.br) (A.L. Colombo).

## Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America

### A B S T R A C T

**Keywords:**  
Recommendations  
Candidemia  
Diagnosis  
Latin America

Candidemia is one of the most frequent opportunistic mycoses worldwide. Limited epidemiological studies in Latin America indicate that incidence rates are higher in this region than in the Northern Hemisphere. Diagnosis is often made late in the infection, affecting the initiation of antifungal therapy. A more scientific approach, based on specific parameters, for diagnosis and management of candidemia in Latin America is warranted.

'Recommendations for the diagnosis and management of candidemia' are a series of manuscripts that have been developed by members of the Latin America Invasive Mycosis Network. They aim to provide a set of best-evidence recommendations for the diagnosis and management of candidemia.

This publication, 'Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America', was written to provide guidance to healthcare professionals on the diagnosis of candidemia, as well as on the usefulness and application of susceptibility testing in patients who have a confirmed diagnosis of candidemia.

Computerized searches of existing literature were performed by PubMed. The data were extensively reviewed and analyzed by members of the group. The group also met on two occasions to pose questions, discuss conflicting views, and deliberate on a series of management recommendations.

'Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America' includes diagnostic methods used to detect candidemia, *Candida* species identification, and susceptibility testing. The availability of methods, their costs and treatment settings are considered.

This manuscript is the first of this series that deals with diagnosis and treatment of invasive candidiasis. Other publications in this series include: 'Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America', 'Recommendations for the management of candidemia in children in Latin America', and 'Recommendations for the management of candidemia in neonates in Latin America'.

This article is also published in English in this issue. It can be found in <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.008>

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Desafíos en el diagnóstico de la candidiasis invasiva

El diagnóstico de la candidiasis invasiva a menudo se efectúa tardíamente, lo que causa una demora en el inicio de la terapia antimicótica. El diagnóstico tardío puede ser el resultado de signos y síntomas clínicos inespecíficos<sup>18</sup>, como la precisión variable de las pruebas diagnósticas disponibles<sup>27</sup>, la demora en el crecimiento de los cultivos de *Candida*<sup>19</sup>, de que los hemocultivos no sean positivos hasta las etapas avanzadas de la infección<sup>18,25</sup>, del inadecuado volumen de la muestra para los hemocultivos<sup>25</sup>, o de los resultados negativos falsos debido al uso de agentes antimicóticos en la profilaxis<sup>25</sup>.

La superación de estas dificultades para el diagnóstico puede mejorar el tiempo requerido hasta instituir el tratamiento de la infección por *Candida*. Aquí se brindan recomendaciones para el diagnóstico de la candidiasis invasiva, incluyendo métodos para detectar la infección, identificación de las especies de *Candida* y pruebas de sensibilidad in vitro a los antifúngicos.

### Métodos para detectar la infección hematogena por *Candida*

Se puede alcanzar el diagnóstico a través de métodos convencionales como el hemocultivo y la detección de marcadores serológicos como el 1-3-β-D-glucano (BDG), el manano o anticuerpos antimanano. Los métodos diagnósticos más nuevos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) en muestras de sangre o biopsia de tejido, y el ensayo inmunoenzimático (ELISA, *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) para detectar *Candida*.

#### Hemocultivo

El hemocultivo es el mejor método disponible para el diagnóstico de la candidemia; sin embargo, es un procedimiento que requiere mucho tiempo. Esto puede afectar el momento de inicio de la terapia antimicótica y contribuir a un incremento de la morbimortalidad<sup>49</sup>. El tiempo hasta la detección puede estar

influido por la especie de *Candida*. En un estudio retrospectivo, el tiempo promedio hasta tener cultivos positivos de *Candida albicans* y *Candida glabrata* fue de  $35,3 \pm 18,1$  y  $80,0 \pm 22,4$  h, respectivamente<sup>19</sup>. El tipo de medio utilizado para el cultivo también puede influir sobre el tiempo hasta la detección. Una comparación de un medio selectivo para hongos y un medio aerobio estándar para el diagnóstico de candidemia mostró un ahorro significativo de tiempo cuando se utilizó el medio específico para hongos, con un ahorro promedio de tiempo de 8,8 h para *C. albicans* y 43,7 h para *C. glabrata*<sup>46</sup>.

Como se mencionó previamente, el hemocultivo es el *gold standard* para el diagnóstico de la candidemia. Sin embargo, su sensibilidad es variable<sup>51</sup>. A fin de optimizar este método se deben considerar cuidadosamente factores que pueden influir sobre la sensibilidad (por ejemplo, el volumen de sangre, el número de cultivos y el tiempo hasta la detección), así como el tamaño del inóculo y el tipo de frascos y medios de cultivo utilizados. En un estudio con 15 especies de *Candida*, los inóculos de mayor tamaño (10, 100, 1.000 células por frasco) brindaron una tasa de detección de crecimiento del 70, 73 y 79%, respectivamente<sup>27</sup>. Se ha observado una tasa similar de detección de *Candida* en frascos aerobios y micológicos<sup>8,27,45</sup>, que es mayor que la observada en frascos anaerobios<sup>8,27</sup>. El Grupo de Trabajo recomienda el uso de frascos aerobios para el diagnóstico de la candidemia mediante hemocultivo dado que este es el procedimiento estándar en todos los hospitales.

#### Sistemas de hemocultivo

Actualmente se dispone de varios sistemas de hemocultivo con diferente sensibilidad. Hay métodos convencionales (manuales), automatizados, y de lisis-centrifugación. El uso de medios bifásicos parece ser ligeramente mejor o equivalente al caldo de cultivo convencional para la recuperación de levaduras<sup>33</sup>. La sensibilidad de los sistemas automatizados de hemocultivo, como BacT/ALERT, BACTEC e Isolator está influida por el tipo de medios y frascos de cultivo utilizados<sup>28,46</sup>. La técnica de hemocultivo con lisis y centrifugación es el método disponible más sensible. Tiene un mejor rendimiento diagnóstico comparado con los sistemas de hemocultivo

convencionales y reduce el tiempo de obtención del resultado<sup>38</sup>. Sin embargo, la lisis-centrifugación implica una alta carga de trabajo, es de alto coste y tiene una alta tasa de contaminación<sup>18</sup>. Por este motivo el Grupo de Trabajo considera que los sistemas de hemocultivo automatizados constituyen la mejor opción para el diagnóstico de la candidemia.

### Serología

Actualmente se encuentran en desarrollo varias pruebas serológicas para la detección de candidemia. Debido a la limitada información sobre su valor diagnóstico, el Grupo de Trabajo no puede efectuar recomendaciones sobre su uso. Estos métodos incluyen el ensayo BDG<sup>65</sup> y los ensayos de detección de manano y de anticuerpos antimano<sup>1,47</sup>. Una reciente revisión de métodos serológicos para el diagnóstico de candidemia en pacientes críticos mostró una mayor sensibilidad diagnóstica con el uso combinado de antígenos y anticuerpos<sup>11</sup>.

BDG es un componente estructural de la pared celular de *Candida* que podría ser de utilidad como biomarcador de candidemia. Estudios que utilizaron el ensayo sérico de BDG para el diagnóstico de candidemia informaron de tasas del 57 al 100% de sensibilidad y del 44 al 92% de especificidad, superiores a las de los hemocultivos<sup>65</sup>. Sin embargo, el test de BDG es proclive a brindar resultados falsos positivos por la contaminación de  $\beta$ -glucanos con algunos antibióticos y materiales<sup>25</sup>. Las fuentes de  $\beta$ -glucanos incluyen membranas de diálisis y filtros hechos de celulosa, productos específicos de inmunoglobulinas, restos de algodón y esponjas utilizadas en cirugías, así como algunos fármacos (por ejemplo, lentinan, cretina, escleroglucano y esquizofilano)<sup>35,37,50,63</sup>. La detección de BDG ha sido ampliamente utilizada en investigación y aprobada por las agencias regulatorias de EE.UU. y Europa para el diagnóstico de la infección por *Candida*. Sin embargo, debido a la falta de disponibilidad y a los elevados costes es probable que muy pocos centros de América Latina utilicen este ensayo. Teniendo en cuenta su elevado valor predictivo negativo, la repetición de las pruebas con resultados negativos puede ayudar a descartar la candidemia. De todas maneras, por el momento no está demasiado claro de qué manera este test puede ser utilizado en la práctica diaria con el fin de ayudar al médico a decidir si se debe o no prescribir un antimicótico a un paciente con riesgo de desarrollar candidemia.

### Detección de infecciones profundas por *Candida*

#### Estudios de imagen

La ecocardiografía ha demostrado ser una herramienta efectiva para el diagnóstico de la endocarditis inducida por especies de *Candida*<sup>15</sup>, y las imágenes de resonancia magnética (RM) y de tomografía computarizada (TC) han mostrado ser efectivas como herramientas no invasivas para la identificación de infección hepatoesplénica<sup>26,43</sup>. Aunque la RM y la TC son sensibles para detectar microabscesos micóticos asociados a la candidiasis diseminada crónica (CDC), el requerimiento de imágenes repetidas durante el curso de una infección limita su empleo. La ecografía asistida por ordenador ha mostrado ser exitosa para detectar microabscesos en el hígado o en el bazo, y puede ser repetida tantas veces como sea necesario, lo que la convierte en un método útil para la detección de CDC y el seguimiento de pacientes con la mencionada candidiasis<sup>36</sup>.

#### Biopsia

El diagnóstico de infecciones por *Candida* a partir de muestras de tejidos puede ser difícil. Estos microorganismos colonizan comúnmente la piel y las membranas mucosas de los seres humanos y, por lo tanto, el aislamiento de muestras superficiales (esputo, secreciones traqueales y orina) no es necesariamente una demostración

de invasión<sup>33</sup>. La infección orgánica profunda por *Candida* puede requerir la biopsia de tejidos para establecer el diagnóstico, tal como sucede en la neumonía producida por *Candida*; sin embargo, las muestras de tejido pueden contener pocos microorganismos y brindar un cultivo negativo<sup>64</sup>. La CDC se diagnostica a través de la identificación de estructuras micóticas en el microscopio o el crecimiento de hongos en materiales de biopsia, dado que los cultivos de sangre son positivos en menos de 20% de los pacientes con CDC<sup>43</sup>. Sin embargo, no siempre se puede detectar la presencia de *Candida* en la biopsia, y en algunos pacientes no sería factible efectuar una biopsia debido al riesgo de complicaciones<sup>43</sup>. En pacientes en riesgo que desarrollan lesiones cutáneas se utiliza la biopsia para confirmar el diagnóstico de infección diseminada; al igual que una biopsia pulmonar confirmará el diagnóstico de neumonía mediante la identificación de elementos micóticos invadiendo el tejido pulmonar.

### Nuevas perspectivas

Recientemente se desarrolló un ELISA para la detección de un antígeno de 65 kDa producido por *C. albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*. En este estudio, esta nueva prueba diagnóstica detectó el antígeno de 65 kDa en el 80% de los pacientes con candidemia<sup>4</sup>. La aparición de la PCR para la detección de ácidos nucleicos ha brindado un método alternativo más rápido y más preciso que el hemocultivo para la detección de especies de *Candida* en las muestras de sangre<sup>41</sup>. Además, se ha utilizado la PCR para la detección de *Candida* en muestras de biopsia en pacientes con CDC<sup>22,39</sup>.

Un reciente metaanálisis que incluyó 54 estudios encontró resultados positivos por PCR en el 85% (78-91%) de los pacientes con candidemia confirmada o posible, en comparación con apenas un 38% (29-46%) de aquellos con hemocultivos positivos<sup>3</sup>. Se ha mejorado la sensibilidad de la PCR para detectar la candidemia con el uso de muestras de suero y plasma en comparación con sangre entera. En un estudio se detectó ADN de *Candida* en el 71% de las muestras de suero y en el 75% de las muestras de plasma, en comparación con el 54% de las muestras de sangre entera<sup>41</sup>. Una limitación de este ensayo es la incapacidad para detectar ADN fúngico en el 25% de las muestras de sangre entera obtenidas al mismo tiempo que las muestras positivas de hemocultivo<sup>41</sup>.

Se han informado resultados que eran falsamente positivos o negativos cuando se utilizó la PCR para la detección de *Candida* en muestras clínicas de sangre, orina y líquido peritoneal<sup>7</sup>. Otro estudio describió resultados positivos falsos en 2 pacientes que habían sido tratados con antimicóticos azólicos, lo que puede indicar que la PCR tenía capacidad de detectar microorganismos no viables que no son recuperados por cultivo<sup>21</sup>. Comparada con los métodos de antígenos y anticuerpos, la PCR tiene mejor sensibilidad y especificidad diagnósticas<sup>11</sup>. A pesar de esto, no existe una estandarización internacional para este método y no hay pruebas de PCR comercialmente disponibles para el diagnóstico de las candidiasis. En consecuencia, los ensayos de PCR no son una herramienta fiable para ser usados en los laboratorios clínicos con el fin de identificar de manera temprana a los pacientes con candidemia.

### Métodos para la identificación de *Candida*

Es importante la identificación precoz de la especie para iniciar la terapia antimicótica apropiada o para modificar la terapia antifúngica en curso. Se puede identificar la especie mediante uno o más de los siguientes métodos: tinción y examen directo convencional, identificación mediante la prueba del tubo germinativo o colonias crecidas en medios cromogénos, panel de identificación de MicroScan Yeast, sistemas comerciales manuales (por ejemplo, API 20C y API 32C), sistemas comerciales automatizados (por ejemplo,

### Sumario de recomendaciones para métodos de diagnóstico en la candidiasis invasiva

1. El hemocultivo es el *gold standard* como método para el diagnóstico de candidiasis invasiva.
2. Se recomiendan los frascos aerobios y los sistemas de hemocultivo automatizados para una óptima sensibilidad.
3. Debe identificarse la especie a la que pertenecen los aislamientos clínicos de *Candida*.

### Otras recomendaciones sobre métodos diagnósticos

1. Los estudios de imágenes (por ejemplo, ecocardiografía, RM y TC) pueden desempeñar un papel en el diagnóstico de la endocarditis y la CDC.
2. Se puede considerar la histopatología y/o la microscopia directa para el diagnóstico de infecciones profundas por *Candida*, tanto para CDC o neumonía. En caso de CDC un examen microscópico negativo no indica la ausencia de enfermedad.

VITEK 2), identificación molecular con PCR, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight* (MALDI-TOF) o hibridación fluorescente *in situ* de ácidos nucleicos peptídicos (*Peptide Nucleic Acid-Fluorescent In Situ Hybridization* [PNA-FISH]).

### Tinción y examen directo convencional

En general, la microscopia directa, utilizando diferentes tinciones, es un método relativamente rápido y barato para identificar inicialmente un patógeno como una levadura o una bacteria<sup>17</sup>. En pacientes con infecciones profundas por *Candida* la identificación microscópica de elementos micóticos en el material de biopsia o el crecimiento de hongos a partir de dichas biopsias se considera el *gold standard* para el diagnóstico de CDC<sup>32</sup> o de la neumonía por *Candida*. También puede ser útil para el diagnóstico de candidiasis hematógena en pacientes que desarrollan lesiones cutáneas secundarias a la diseminación de *Candida*.

El diagnóstico microbiológico de infecciones fúngicas por microscopia directa de cortes de tejidos se realiza generalmente utilizando preparaciones en fresco (con hidróxido de potasio o blanco de calcofluor) y tinciones de Gram, Wright o Giemsa<sup>48</sup>. En las muestras se debe examinar la presencia de levaduras pequeñas, redondas u ovals, con gemaciones de pared delgada, que se observan agrupadas y con ramificaciones de pseudohifas<sup>62</sup>; sin embargo, otros tipos de hongos también pueden mostrar esta morfología. Por tal motivo, puede ser necesaria la realización de otros exámenes para excluir otros géneros de hongos. La cápsula de *Cryptococcus* puede ser visualizada como un halo rojizo evanescente con la tinción de Gram, y la observación de artroconidias puede indicar la presencia de *Trichosporon*<sup>53</sup>. Es importante tener en cuenta que un examen microscópico negativo no excluye necesariamente una infección<sup>23,48</sup>.

### Peptide nucleic acid-fluorescent in situ hybridization

El PNA-FISH es un novedoso método molecular que ayuda a la rápida identificación de las especies más relevantes clínicamente de *Candida*<sup>60</sup>. Después de realizada una tinción de Gram para comprobar la presencia de *Candida*, se pueden estudiar las preparaciones con PNA-FISH: se observará una fluorescencia que es específica para determinadas especies de *Candida*. A pesar de que es un test útil, la necesidad de emplear microscopia fluorescente y el coste de los reactivos limita el uso de este ensayo en los laboratorios clínicos en América Latina.

### Examen fenotípico del cultivo

#### Detección rápida

El examen de la producción del tubo germinativo es un método fácil y rápido para la identificación presuntiva de *C. albicans*<sup>57</sup>.

#### Medios cromógenos

En América Latina, el Grupo de Trabajo recomienda el uso del medio CHROMagar Candida para la identificación de *Candida* dado que es más preciso, aunque también se dispone de otros medios cromógenos de menor coste (por ejemplo, el medio comercializado por Oxoid). En un estudio, el medio CHROMagar Candida permitió la identificación de la especie en el 93% de los cultivos obtenidos, con una precisión de hasta el 92% a las 48 h. El coste de esta técnica fue similar al de los métodos convencionales, por lo que es un método de examen que puede ser sufragado por laboratorios de países con recursos limitados<sup>30</sup>. Una restricción del método CHROMagar Candida es la falta de un amplio rango de colores, lo que reduce la identificación a un número limitado de especies. Esto incluye *C. albicans* (indistinguible por este método de *Candida dubliniensis*), *C. tropicalis* y *Candida krusei*. Los aislamientos de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr* y *Candida lusitanae* tienen tonos variables en CHROMagar Candida, desde un blanco grisáceo hasta el rosa que son difíciles de definir dado que son tonos pasteles muy similares y no son específicos de ninguna de las especies<sup>66</sup>. Esta limitación subraya la necesidad de métodos alternativos para una identificación más exacta de las especies de *Candida*<sup>5</sup>. Al realizar el cultivo de muestras biológicas o de levaduras previamente aisladas en medios cromógenos es importante comprobar la presencia de cultivos mixtos que podrían indicar infecciones por más de un hongo patógeno.

CHROMagar Candida se prepara de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se vierte en tubos de ensayo o placas de Petri estériles, permitiendo que se convierta en un gel. Las placas preparadas con el medio de cultivo pueden ser guardadas durante 24 h a temperatura ambiente o durante un mes si se conservan en refrigeración y protegidas de la luz y la deshidratación<sup>9</sup>. Si son refrigeradas, las placas deben ser calentadas hasta alcanzar la temperatura ambiente hasta la inoculación de la muestra, efectuada mediante surcos sobre la placa e incubación a 30-37 °C durante 48 h<sup>9</sup>. La identificación de las especies se basa en el color de las colonias (tabla 1)<sup>29,52</sup>.

### Pruebas fenotípicas para la identificación de Candida

Es esencial que se identifiquen la especie de todos los aislamientos que causan infecciones fúngicas invasivas. La identificación de las especies puede ser determinada mediante los siguientes métodos.

#### Métodos clásicos caseros

Es posible verificar el perfil bioquímico de los aislamientos de levaduras utilizando pruebas caseras de fermentación y asimilación de azúcares. Varios laboratorios en América Latina preparan sus propios paneles de pruebas bioquímicas, que incluyen de 7 a 12 azúcares diferentes para asimilación y fermentación. Los resultados de dichos ensayos pueden ser comparados con los descritos

**Tabla 1**

Color de las colonias según la especie tras incubación durante 2 días en medio CHROMagar Candida a 37 °C

Especies	Color y morfología <sup>52</sup>
<i>Candida albicans</i>	Verde
<i>Candida tropicalis</i>	Azul oscuro a azul grisáceo (con un halo rosa en el agar)
<i>Candida krusei</i>	Rosa pálido a púrpura (de tono intenso y bordes más pálidos) y de textura seca

en diferentes bases de datos existentes en libros de texto para determinar la especie.

#### Sistemas comerciales manuales

El perfil bioquímico de los aislamientos clínicos que se desea identificar puede ser comprobado mediante pruebas comerciales. Varios sistemas brindan diferentes parámetros asociados al crecimiento de las colonias y de la utilización de algún sustrato particular. Algunos detectan cambios en la turbidez al comparar con un pocillo de control (por ejemplo, API 20C AUX y API 32C), mientras que otros utilizan la producción o cambio de un determinado color en una serie de pocillos (por ejemplo, API Candida, Auxacolor y Uni-Yeast-Tek)<sup>18</sup>. Estas pruebas brindan resultados precisos para las especies más comunes de *Candida*, pero no son tan fiables para la identificación de las especies menos comunes. La precisión de los resultados depende en gran medida del número de ensayos disponibles en cada sistema comercial, así como de su base de datos (que puede ser limitada o amplia).

#### Sistemas comerciales automatizados

VITEK 2 es un instrumento completamente automatizado que utiliza una tecnología fluorescente para la identificación de levaduras y pseudolevaduras en 15 h<sup>24</sup>. La tarjeta fluorométrica inicial ha sido reemplazada por una tarjeta colorimétrica con el fin de ampliar la base de datos<sup>2</sup>. El panel de identificación de levaduras MicroScan es un sistema de microdilución para la identificación de levaduras en 4 h. Tiene una tasa de éxito del 94% para la identificación de 22 especies de *Candida*<sup>40,59</sup>.

#### Identificación molecular

Como se mencionó previamente, la PCR puede ser utilizada para la detección de ácidos nucleicos fúngicos. También puede servir para identificar especies de *Candida* en muestras de sangre, con una reducción del tiempo de identificación de las especies a 7 h en comparación con una media de 3,5 días con los métodos fenotípicos habituales<sup>58</sup>. Además, la PCR puede detectar la presencia de más de una especie de *Candida* en un mismo paciente, mientras que los hemocultivos suelen demostrar solamente una especie. La capacidad de detectar e identificar más de una especie de *Candida* influye sobre el tratamiento y los resultados, particularmente cuando una de las especies es resistente a los compuestos azólicos<sup>14</sup>.

#### Nuevas perspectivas (proteómica)

Se han utilizado sistemas de espectrometría de masa (MALDI-TOF) para la identificación de *Candida* en menos de 30 min con una identificación correcta de hasta el 91%<sup>20</sup>. Se ha demostrado que el sistema MALDI-TOF tiene una tasa de éxito del 100% para la identificación de aislamientos de *Candida*, frente al 92% utilizando métodos bioquímicos (VITEK 2 y API C AUX)<sup>42</sup>.

La disponibilidad de métodos específicos de diagnóstico para la detección e identificación de una candidemia depende del marco clínico. Para los hospitales pequeños que no atienden a pacientes trasplantados ni tratan a muchos pacientes hematológicos o inmunodeficientes, el requerimiento mínimo sugerido por el Grupo de Trabajo para la identificación de levaduras es la capacidad de evaluar la micromorfología de las colonias complementada con la búsqueda de las principales especies de *Candida* utilizando el medio CHROMagar Candida, alguna prueba comercializada o un método casero para realizar las pruebas bioquímicas. En los hospitales terciarios, además de la micromorfología y del CHROMagar Candida, se recomienda la identificación mediante sistemas comerciales manuales (API 20C, API 32C), sistemas comerciales automatizados (VITEK 2) o métodos moleculares. Se debe considerar el uso de métodos moleculares para la identificación de

patógenos emergentes cuando las herramientas convencionales brinden una identificación inconsistente y cuando se debe identificar un brote de infecciones fúngicas.

#### Sumario de recomendaciones para la identificación de especies de *Candida*

1. El Grupo de Trabajo recomienda, como mínimo requerimiento, la observación de la micromorfología de las colonias complementada con la macromorfología utilizando el medio CHROMagar Candida.
2. Para hospitales secundarios se recomienda la identificación de las especies utilizando uno o más de los siguientes métodos:
  - a) Micromorfología de las colonias.
  - b) Macromorfología (medio CHROMagar Candida).
  - c) Pruebas bioquímicas.
    - I) Métodos convencionales caseros.
    - II) Sistemas comerciales manuales con una base de datos limitada (por ejemplo, Auxacolor y Uni-Yeast-Tek).
3. Para los hospitales de nivel terciario donde se tratan pacientes trasplantados, hematológicos o inmunodeficientes, el Grupo de Trabajo recomienda como requerimiento mínimo lo siguiente:
  - a) Micromorfología complementada por pruebas bioquímicas (API 20C, API 32C, VITEK 2 o MicroScan Yeast Identification Panel).
  - b) Métodos moleculares en situaciones específicas.
4. Se deben considerar los métodos moleculares (PCR y MALDI-TOF) para la identificación de patógenos emergentes y cuando se investigan brotes de infección fúngica.

#### Métodos para pruebas de sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos

Es importante tener en cuenta que la identificación de las levaduras siempre debe tener prioridad sobre las pruebas de sensibilidad. El conocimiento local de la sensibilidad de los aislamientos clínicos a los antimicóticos puede influir en la elección del tratamiento. El Grupo de Trabajo alienta la colaboración entre laboratorios cuando se realizan pruebas de sensibilidad, ya que esto se traduce en una reducción de costes y un incremento de la precisión.

Si se efectúan pruebas de sensibilidad se debe tener en cuenta que todavía hay algunas controversias respecto a la definición de los valores de corte clínico para las equinocandinas y la anfotericina B. Las pruebas de detección de resistencia a fluconazol brindan resultados más fiables en comparación con otros agentes antifúngicos. Existen varias pruebas de sensibilidad in vitro para *Candida*. Entre estas se incluyen métodos como el M27-A del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el EDef 7.1 del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), métodos de difusión de disco (por ejemplo, el M44-A del CLSI), sistemas comerciales diversos (Fungitest, Sensititre YeastOne, Etest y Neo-Sensitabs) y otros métodos como la citometría de flujo y el VITEK 2.

#### Métodos de referencia para pruebas de sensibilidad de *Candida*

El método M27-A de dilución en caldo fue aprobado por el CLSI en 1997<sup>54</sup>, y actualmente se le conoce como el método CLSI<sup>10</sup>. El método de dilución en caldo del EUCAST<sup>61</sup> es conocido como EDef 7.1. Tanto el M27-A del CLSI como el EDef 7.1 del EUCAST especifican el tamaño del inóculo, los medios de cultivo, la duración y

temperatura de incubación, y la lectura de los valores finales para los fármacos examinados (tabla 2).

Aunque con el método EDef 7.1 se obtienen habitualmente valores de concentración inhibitoria mínima (MIC, *minimum inhibitory concentration*) ligeramente inferiores<sup>16,55</sup>, ambos métodos brindan similares resultados, lo que indica que ambas metodologías no tienen dificultad para obtener estándares uniformados de pruebas de sensibilidad antifúngica. Sin embargo, estos métodos son de alto coste y representan una elevada carga de trabajo. Por lo tanto, su uso en los laboratorios de hospitales es actualmente limitado. Muchos laboratorios hospitalarios prefieren utilizar productos comercialmente disponibles que parecen ser más rápidos y más precisos que el método M27-A.

El método difusión de disco (M44-A del CLSI) brinda una zona de inhibición del crecimiento fúngico alrededor del disco, una medición que puede ser correlacionada con el valor de MIC. Para el fluconazol se ha demostrado una buena correlación entre las pruebas de sensibilidad basadas en disco y el método de referencia M27-A<sup>44,54</sup>. Este método no es muy utilizado en América Latina, ya que los discos de fluconazol y voriconazol tienen una distribución limitada.

#### Pruebas de sensibilidad comerciales

Es importante tener en cuenta que algunos de los productos comerciales que se presentan en esta sección quizá no estén actualmente comercializados en América Latina. Los sistemas comerciales de valoración de MIC basados en caldos incluyen Candifast, Integral Systems Yeasts y Fungitest. Sin embargo, estos métodos muestran una correlación limitada con el método de referencia M27-A<sup>54</sup>.

El Sensititre YeastOne genera una respuesta colorimétrica. Este método tiene una concordancia  $\geq 85\%$  con el método de referencia M27-A<sup>54</sup>, y del 92% con el método de referencia EDef 7.1<sup>13</sup>. Un trabajo reciente mostró una alta concordancia entre Sensititre YeastOne y el método del EUCAST, con una concordancia básica (global)  $\geq 95,5\%$ , según el antimicótico examinado<sup>12</sup>.

El E-test es una prueba de sensibilidad antimicrobiana que ha sido adaptada para ser utilizada con agentes antifúngicos. En este sencillo método el hongo es inoculado en la superficie de una placa de agar sobre la que se coloca una tira plástica que contiene

un gradiente de concentraciones del antimicótico. Después de la incubación de un hongo sensible se puede observar una zona de inhibición y el valor de MIC se lee en el punto en el que la zona intersecciona con la tira<sup>31</sup>. Se ha descrito como aceptable la correlación entre el método E-test y los métodos de referencia M27-A y EDef 7.1 para la mayoría de las especies de *Candida* y para los antifúngicos azólicos<sup>13,54</sup>.

Neo-Sensitabs es un sistema comercial basado en discos o tabletas. Los resultados de este sistema no se correlacionan bien con los métodos de referencia M27-A y EDef 7.1<sup>13,54</sup>.

#### Otros métodos para valorar la sensibilidad

Desde hace largo tiempo se reconoce el uso de la citometría de flujo como una herramienta potencial para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, y se ha descrito que brinda resultados rápidos en comparación con los métodos de referencia<sup>34,56</sup>. El sistema VITEK 2, utilizado para la identificación de levaduras, también puede ser empleado para el estudio de la sensibilidad. Un estudio comparativo encontró una excelente concordancia (del 92 al 98,2%) entre VITEK 2 y el método de referencia M27-A para la determinación de los valores MIC a los antimicóticos; sin embargo, se observaron discrepancias entre las especies<sup>6</sup>.

#### Sumario de recomendaciones para pruebas de sensibilidad de *Candida*

1. La identificación de las levaduras siempre debe tener prioridad sobre las pruebas de sensibilidad.
2. Los laboratorios deben colaborar entre sí a fin de reducir los costes e incrementar la precisión de las pruebas.
3. Se recomiendan las pruebas de sensibilidad al fluconazol para los hospitales de atención terciaria.

#### Conflicto de intereses

A.L. Colombo ha recibido ayudas para la investigación de Pfizer, MSD, United Medical y Luminex, y ayudas para la formación médica de Pfizer, MSD, United Medical y Astellas. Además, ha ejercido como

**Tabla 2**  
Características de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos del CLSI y del EUCAST

Característica	M27-A3 de CLSI <sup>10</sup>	EDef. 7.1 de EUCAST <sup>61</sup>
Indicado para	Levaduras	Levaduras fermentativas
Inóculo	$0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/ml	$0,5 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^5$ UFC/ml
Estandarización del inóculo	Espectrofotométrica, con estándar de referencia de BaSO <sub>4</sub> (turbidez de 0,5 en la escala de McFarland)	Espectrofotométrica, con estándar de referencia de BaSO <sub>4</sub> (turbidez de 0,5 en la escala de McFarland)
Medio de prueba	RPMI 1640, pH 7,0 con buffer MOPS 0,165 M	RPMI 1640, pH 7,0 con buffer MOPS 0,165 M y glucosa 2% w/v
Formato	Macrodilución o microdilución	Microdilución
Temperatura	35 °C	35 °C
Duración de la incubación	24–48 h	24 h ( <i>Candida</i> )
Resultado	Pocillo ópticamente claro para anfotericina B, reducción de aproximadamente el 50% en crecimiento visible (prueba de microdilución con flucitosina, equinocandinas y azoles <sup>a</sup> )	Pocillo ópticamente claro para anfotericina B, reducción de aproximadamente el 90% en crecimiento visible; para anidulafungina, caspofungina, flucitosina y azoles <sup>a</sup> El resultado de MIC es la concentración más baja del fármaco en el que se reduce el 50% o más el crecimiento de los aislamientos en comparación con el control (MIC-2 o $\geq 50\%$ )
Control de calidad de los aislamientos y los fármacos	Dos aislamientos de <i>Candida</i> frente a anfotericina B, flucitosina, azoles <sup>a</sup> , caspofungina y anidulafungina	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 y <i>Candida krusei</i> ATCC 6258

Adaptada de Rodríguez-Tudela et al.<sup>55</sup>

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing; MIC: concentración mínima inhibitoria; MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico; RPMI: Roswell Park Memorial Institute; UFC: unidades formadoras de colonias; w/v: peso/volumen.

<sup>a</sup> Fluconazol, voriconazol, ketoconazol, itraconazol, ravuconazol y posaconazol.

consultor para MSD, Pfizer y Gilead. J.A. Cortes ha recibido de Pfizer y MSD ayudas para la investigación y para la asistencia a charlas de formación médica. M. Nucci ha recibido ayudas para la investigación de Pfizer y MSD, y ha sido consultor y conferenciante para Pfizer, Merck, Astellas y Gilead. F. de Queiroz Telles ha participado en cursos de formación continuada en laboratorios de Astellas, MSD, Pfizer y United Medical, y en programas de investigación en laboratorios de Astellas, MSD y Pfizer. I.N. Tiraboschi ha sido conferenciante para Pfizer y Gilead. J. Zurita ha sido miembro del consejo asesor y consultor de Pfizer, ha recibido ayudas para la investigación de Wyeth y MSD por su participación en el estudio SMART.

## Agradecimientos

Jacqueline Adam, PhD, de Choice Healthcare Solutions, brindó asistencia editorial para la redacción del primer borrador, los comentarios de los revisores y las sugerencias editoriales para las versiones en borrador del manuscrito; los fondos fueron provistos por Pfizer. Los autores son responsables de las opiniones, conclusiones y recomendaciones.

## Bibliografía

- 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 Infect Dis.* 2007;7:103.
- Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. *J Clin Microbiol.* 2006;44:227-8.
- Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2011;49:665-70.
- Berzagli R, Colombo AL, Machado AM, de Camargo ZP. New approach for diagnosis of candidemia based on detection of a 65-kilodalton antigen. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:1538-45.
- Bishop JA, Chase N, Lee R, Kurtzman CP, Merz WG. Production of white colonies on CHROMagar *Candida* medium by members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3498-500.
- Borghetti E, Iatta R, Sciota R, Biassoni C, Cuna T, Montagna MT, et al. Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: The GISIA3 study. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3153-7.
- Burgener-Kairuz P, Zuber JP, Jaunin P, Buchman TG, Bille J, Rossier M. Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1902-7.
- Chiarini A, Palmeri A, Amato T, Immordino R, Distefano S, Giammanco A. Detection of bacterial and yeast species with the Bactec 9120 automated system with routine use of aerobic, anaerobic, and fungal media. *J Clin Microbiol.* 2008;46:4029-33.
- CHROMagar. CHROMagar *Candida* chromogenic medium for the isolation and differentiation of major *Candida* species. 2009.
- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard - third edition. 2008.
- Cortés JA, Concha MA, Cediell TL, Castillo JS. Diagnostic methods in candidemia: a systematic review of literature with meta-analysis. *Rev Chilena Infectol.* 2011;28:423-8.
- 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 clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1782-6.
- Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:486-92.
- Del Negro GM, Delgado AF, Manuli ER, Yamamoto L, Okay TS. Dual candidemia detected by nested polymerase chain reaction in two critically ill children. *Med Mycol.* 2010;48:1116-20.
- Donal E, Abgueuen P, Coisne D, Gouello JP, McFadden EP, Allal J, et al. Echocardiographic features of *Candida* species endocarditis: 12 cases and a review of published reports. *Heart.* 2001;86:179-82.
- Duarte C, Pulido N, Rivas P, Sánchez R, Cortés JA, Cuervo S, et al. CLSI microdilution M27-A2 and EUCAST method comparison for *Candida* spp. in patients with cancer. *Rev Infect.* 2010;14(52):S107-15.
- Dunn DL. Diagnosis and treatment of infection. En: Norton JA, Barie PS, Bollinger R, Chang AE, Lowry SF, Mulvihill SJ, et al., editores. *Surgery: Basic science and clinical evidence.* Springer; 2008. p. 209-35.
- Ellepolu AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol.* 2005;43 Spec No:65-84.
- Fernandez J, Erstad BL, Petty W, Nix DE. Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64:402-7.
- Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1542-8.
- Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol.* 1998;36:395-401.
- Fleischhacker M, Schulz S, Johrens K, von Lilienfeld-Toal M, Held T, Fietze E, et al. Diagnosis of chronic disseminated candidosis from liver biopsies by a novel PCR in patients with haematological malignancies. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:1010-6.
- Gilad J, Giladi M, Schwartz D. *Candida albicans* masquerading as Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *Scand J Infect Dis.* 2007;39:907-10.
- Graf B, Adam T, Zill E, Gobel UB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1782-5.
- Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sa M, Johnson EM, et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med.* 2009;35:55-62.
- Halkic N, Ksontini R. Images in clinical medicine. Hepatosplenic candidiasis. *N Engl J Med.* 2007;356:e4.
- Horvath LL, George BJ, Hospenthal DR. Detection of fifteen species of *Candida* in an automated blood culture system. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3062-4.
- Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for *Candida* growth detection. *J Clin Microbiol.* 2004;42:115-8.
- Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2629-32.
- Iyampillai T, Michael JS, Mathai E, Mathews MS. Use of CHROMagar medium in the differentiation of *Candida* species: is it cost-effective in developing countries? *Ann Trop Med Parasitol.* 2004;98:279-82.
- Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61 Suppl 1:i13-8.
- Johnson TL, Barnett JL, Appelman HD, Nostrand T. *Candida* hepatitis. Histopathologic diagnosis. *Am J Surg Pathol.* 1988;12:716-20.
- Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:32-45.
- Joung YH, Kim HR, Lee MK, Park AJ. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *J Infect.* 2007;54:504-8.
- Kanda H, Kubo K, Hamasaki K, Kanda Y, Nakao A, Kitamura T, et al. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-beta-D-glucan level. *Kidney Int.* 2001;60:319-23.
- Karthaus M, Huebner G, Elser C, Geissler RG, Heil G, Ganser A. Early detection of chronic disseminated *Candida* infection in leukemia patients with febrile neutropenia: value of computer-assisted serial ultrasound documentation. *Ann Hematol.* 1998;77:41-5.
- Kato A, Takita T, Furuhashi M, Takahashi T, Maruyama Y, Hishida A. Elevation of blood (1→3)-beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron.* 2001;89:15-9.
- Kiehn TE, Wong B, Edwards FF, Armstrong D. Comparative recovery of bacteria and yeasts from lysis-centrifugation and a conventional blood culture system. *J Clin Microbiol.* 1983;18:300-4.
- Kirby A, Chapman C, Hassan C, Burnie J. The diagnosis of hepatosplenic candidiasis by DNA analysis of tissue biopsy and serum. *J Clin Pathol.* 2004;57:764-5.
- Land GA, Salkin IF, el-Zaatari M, McGinnis MR, Hashem G. Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme-based yeast identification system. *J Clin Microbiol.* 1991;29:718-22.
- 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.
- Martinez-Lamas L, Perez del Molino ML, Pardo F, Varela E, Regueiro BJ. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry vs conventional methods in the identification of *Candida* non-albicans. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2011;29:568-72.
- Masood A, Sallah S. Chronic disseminated candidiasis in patients with acute leukemia: emphasis on diagnostic definition and treatment. *Leuk Res.* 2005;29:493-501.
- Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1647-51.
- McDonald LC, Weinstein MP, Fune J, Mirrett S, Reimer LG, Reller LB. Controlled comparison of BacT/ALERT FAN aerobic medium and BATEC fungal blood culture medium for detection of fungemia. *J Clin Microbiol.* 2001;39:622-4.
- Meyer MH, Letscher-Bru V, Jaulhac B, Waller J, Candolfi E. Comparison of Mycosis IC/F and plus Aerobic/F media for diagnosis of fungemia by the Bactec 9240 system. *J Clin Microbiol.* 2004;42:773-7.

47. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. 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.
48. Morace G, Borghi E. Fungal infections in ICU patients: Epidemiology and the role of diagnostics. *Minerva Anesthesiol*. 2010;76:950–6.
49. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:3640–5.
50. Nakao A, Yasui M, Kawagoe T, Tamura H, Tanaka S, Takagi H. False-positive endotoxemia derives from gauze glucan after hepatectomy for hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *Hepatogastroenterology*. 1997;44:1413–8.
51. Neofytos D, Marr K. Diagnosis of invasive fungal disease. En: Safdar A, editor. *Management of infections in cancer patients*. New York: Springer; 2011. p. 261–72.
52. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 1994;32:1923–9.
53. Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM. Part III: Systemic mycoses caused by opportunistic yeasts and *Pneumocystis*. Hoboken (New Jersey): Fundamental Medical Mycology: John Wiley & Sons; 2011.
54. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:643–58.
55. Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW, et al. Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E. Dis. 7. 1) and CLSI (M27-A2). *J Clin Microbiol*. 2007;45:109–11.
56. Rudensky B, Broidie E, Yinnon AM, Weitzman T, Paz E, Keller N, et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:106–9.
57. Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3508–9.
58. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1454–9.
59. St Germain G, Beauchesne D. Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification panel. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2296–9.
60. Stone NR, Gorton RL, Barker K, Ramnarain P, Kibbler CC. Evaluation of PNA-FISH yeast traffic light for rapid identification of yeast directly from positive blood cultures and assessment of clinical impact. *J Clin Microbiol*. 2013;51:1301–2.
61. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:398–405.
62. The University of Adelaide. Mycology Online. 2011 [citado 15 Ago 2011]. Disponible en: <http://www.mycology.adelaide.edu.au>
63. Usami M, Ohata A, Horiuchi T, Nagasawa K, Wakabayashi T, Tanaka S. Positive (1→3)-beta-D-glucan in blood components and release of (1→3)-beta-D-glucan from depth-type membrane filters for blood processing. *Transfusion*. 2002;42:1189–95.
64. Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. En: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE, editores. *Essentials of Clinical Mycology*. 2nd ed. New York: Springer; 2011. p. 167–206.
65. Wheat LJ. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. *Clin Chest Med*. 2009;30:367–77, viii.
66. Yucesoy M, Marol S. Performance of CHROMAGAR *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2003;2:8.