

ipoc

Anno 1 • 2 • 2013

Periodico
Attualità
la Clinica
e Terapia
Infezioni
Fungine

Infezioni *nel* Paziente Critico

a cura di
Francesco G. De Rosa

EDIZIONI INTERNAZIONALI SRL

EDMES

Infezioni fungine in medicina interna: il punto di vista del microbiologo

Salvatore Oliveri, Laura Trovato

Laboratorio Centralizzato di Agalisi, A.O.U. "Policlinico Vittorio Emanuele",
Dipartimento di Scienze Bio-Mediche, Università degli Studi di Catania

L'incidenza delle infezioni fungine invasive (IFI) è aumentata significativamente negli ultimi anni in seguito alla crescente complessità delle procedure chirurgiche, all'aumento del numero dei fattori di rischio che predispongono a tali infezioni e all'introduzione di terapie sempre più efficaci che hanno consentito l'allungamento della sopravvivenza dei pazienti critici e immunodepressi (1, 2).

Da un recente studio prospettico avviato per il rilevamento delle candidemie in Italia è emerso come, dopo le terapie intensive, la maggior parte degli episodi di candidemia sono stati osservati in reparti di medicina interna (3). In effetti negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi dati relativi all'incidenza delle candidemie in medicina e ai possibili fattori di rischio correlati allo sviluppo dell'infezione (2, 4, 5).

In particolare è stato evidenziato come, in pazienti adulti ricoverati in medicina, la durata della nutrizione parenterale totale e periferica (>7 giorni) sia fortemente associata allo sviluppo della candidemia, mentre la presenza di catetere venoso centrale e la somministrazione di antibiotici glicopeptidici sono fattori indipendentemente associati con l'aumento del rischio di sviluppare tale infezione (4). Recentemente a Catania, abbiamo proposto, in collaborazione con l'infettivologo della nostra azienda, uno studio atto a valutare l'impatto di uno specifico approccio clinico-diagnostico-terapeutico sul rischio di sviluppo delle candidosi invasive in medicina interna. In particolare, dopo aver stabilito sulla base dei dati di letteratura, i fattori di rischio, gli aspetti clinici, i fattori predittivi e le strategie diagnostiche da utilizzare (*Figura 1*), abbiamo stilato una *flow-chart* clinico-diagnostico-terapeutica (*Figura 2*).

La scelta relativa all'approccio diagnostico da utilizzare è stata fortemente influenzata dal fatto che probabilmente molte delle problematiche connesse alla diagnosi delle infezioni fungine invasive (IFI), già ben indi-

viduate nel paziente critico ricoverato in unità di terapia intensiva (UTI) nella mancanza di segni e sintomi specifici, sono riscontrabili anche nel paziente ricoverato in medicina, per il quale tra l'altro mancano specifici protocolli e timing diagnostici da utilizzare al fine di limitare il più possibile approcci terapeutici del tutto empirici. Infatti, indipendentemente dalla tipologia del paziente, ancora oggi la diagnosi certa di malattia fungina invasiva (IFI) rimane basata su metodi diagnostici convenzionali che prevedono l'osservazione microscopica di elementi fungini nei tessuti dell'ospite e l'isolamento in coltura da siti sterili ed in particolare dal sangue (6), con tutte quelle che sono le problematiche connesse con la difficoltà del prelievo e la scarsa sensibilità di queste metodiche.

Il significato diagnostico degli esami di laboratorio convenzionali è strettamente correlato al campione clinico preso in esame e al fungo coinvolto. Considerando l'invasività delle procedure necessarie ad ottenere biopsie, molto spesso tali indagini vengono eseguite su campioni clinici in cui l'osservazione microscopica e l'isolamento di colonie di *Candida* o *Aspergillus* non necessariamente sono associate ad infezioni invasive ma spesso

S. Oliveri, C. Iacobello, L. Trovato

SCHEDULA DI RISK ASSESSMENT E TERAPIA DELLE CANDIDOSI INVASIVE IN MEDICINA

FATTORI DI RISCHIO	ASPETTI CLINICI	FATTORI PREDITTIVI
<input type="checkbox"/> Chirurgia maggiore <input type="checkbox"/> Granulocitopenia <input type="checkbox"/> Mucositi <input type="checkbox"/> Diabete <input type="checkbox"/> Insufficienza renale cronica <input type="checkbox"/> Tumori solidi <input type="checkbox"/> Processi emo-linfoproliferativi <input type="checkbox"/> Trapianto	<input type="checkbox"/> Febbre <input type="checkbox"/> Leucocitosi o Leucopenia <input type="checkbox"/> Sepsis grave + MOF <input type="checkbox"/> Alterazioni oculari <input type="checkbox"/> Alterazioni del sensorio <input type="checkbox"/> Localizzazioni d'organo <input type="checkbox"/> Mancata risposta alla terapia antibiotica	<input type="checkbox"/> Antibiotico terapia (1-3 gg) o Presenza di un CVC (1-3 gg) o NTP (1-3 gg) più almeno due dei seguenti: <input type="checkbox"/> Ospedalizzazione in UTI > 7 giorni <input type="checkbox"/> Diabete mellito scompensato <input type="checkbox"/> Dialisi (1-3 gg) <input type="checkbox"/> Chirurgia maggiore addominale (0-7 gg) <input type="checkbox"/> Pancreatite (0-7 gg) <input type="checkbox"/> Uso di steroidi (0-7 gg) <input type="checkbox"/> Chemioterapia (0-7 gg) <input type="checkbox"/> Colonizzazione multifocale (almeno due siti)
ESAMI MICOLOGICI DI BASE (da eseguire una volta a settimana) <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Broncoaspirato o tampone faringeo <input type="checkbox"/> Tampone rettale <input type="checkbox"/> Urine <input type="checkbox"/> Anticorpi anti <i>Candida</i> fase miceliale (IgG) 		
work up diagnostico (da eseguire due volte a settimana) <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Emocoltura* (sulla base delle condizioni cliniche e mediante sistema lisi centrifugazione) <input type="checkbox"/> Antigene beta-glucano** <input type="checkbox"/> Anticorpi anti <i>Candida</i> fase miceliale su siero PIU' INDAGINI SULLA COLONIZZAZIONE (da eseguire una volta a settimana)		* Seguire le linee guida dell'ESCMID. Clin Microbiol Infect 2012; 18 (Suppl. 7): 9-18 ** Possibili fattori: influenzanti la determinazione dell'antigene beta glucano: emodialisi con membrana di cellulosa, somministrazione di immunoglobuline o albumina, uso di antibiotici, infezioni batteriche, uso di garze, severa mucosite. Clinical Infectious Diseases 2011;52(6):750-770

Figura 1 - Fattori di rischio, aspetti clinici, fattori predittivi e indagini di laboratorio.

FLOW CHART 1

PRESENZA DI UNO O PIU' FATTORI DI RISCHIO

Esami micologici di base

1. Indice di colonizzazione (IC) < 0.5 e/o IgG $\leq 1/160$

⇒ Continuare il monitoraggio del paziente con gli esami micologici di base una volta a settimana

2. IC > 0.5 o IgG $\geq 1/160$ e almeno due aspetti clinici

⇒ Work up diagnostico

- Beta glucano ≥ 160 pg/ml + Procalcitonina (PCT) ≤ 2 ⇒ Inizio terapia con fluconazolo*
- Beta glucano < 160 pg/ml ⇒ Continuare Work up diagnostico

FLOW CHART 2

PRESENZA DI UNO O PIU' FATTORI DI RISCHIO + FATTORI PREDITTIVI POSITIVI

Work up diagnostico

1. Beta glucano ≥ 160 pg/ml

⇒ Inizio terapia con Echinocandine (eseguire il beta glucano ogni due giorni)

2. Beta glucano negativo + almeno due aspetti clinici

⇒ Work up diagnostico

1. Beta glucano < 160 pg/ml + almeno due aspetti clinici

⇒ Inizio terapia empirica con Fluconazolo* (eseguire il beta glucano ogni due giorni)

* Ad eccezione di pazienti pretrattati con azoli o colonizzati da *C. glabrata*. In questo caso iniziare terapia con echinocandine

Figura 2 - Flow chart clinico-diagnostico-terapeutica.

a colonizzazioni delle mucose. Tuttavia, nonostante la colonizzazione da *Candida* non sia necessariamente associata all'infezione invasiva, molti studi sono stati avviati soprattutto in pazienti chirurgici e ricoverati in UTI, per valutare quanto questo parametro sia predittivo per lo sviluppo della candidosi invasiva.

In particolare l'indice di colonizzazione (CI), studiato nel 1994 da Pittet in una popolazione di pazienti chirurgici con l'obiettivo di predire coloro che avrebbero sviluppato la candidosi invasiva, è stato utilizzato come base per l'avvio di una terapia pre-emptiva (7).

Successivamente la colonizzazione multifocale da *Candida* è stata utilizzata come uno dei parametri per definire un sistema di punteggio, denominato "Candida score" e utilizzato per la selezione dei pazienti da

sottoporre ad un precoce trattamento antifungino (8). Quindi lo studio della colonizzazione può rappresentare ancora oggi un valido strumento, utilizzabile anche sul paziente ricoverato in medicina che, in associazione ad altri parametri, potrebbe contribuire a selezionare i pazienti a più alto rischio per lo sviluppo della candidosi invasiva da sottoporre a un work up diagnostico. La possibilità di conoscere le specie di *Candida* colonizzanti potrebbe avere inoltre importanti ricadute anche sulla strategia terapeutica. Infatti, considerando che l'inizio di un tempestivo trattamento antifungino è correlato con un miglioramento dell'outcome del paziente (8) l'identificazione del microrganismo a livello di specie diventa indispensabile anche nello studio della colonizzazione visto che non tutte le specie di *Candida* presentano la stessa sensibilità verso i farmaci antifungini e lo stesso grado di patogenicità. Oggi ci sono a disposizione diversi metodi commerciali, come l'API ID32C, RapID Yeast Plus e Vitek 2, che presentano buone performance per l'identificazione dei lieviti. La maggior parte dei metodi commerciali per le echinocandine fanno riferimento al breakpoint CLSI. Inoltre diverse tecniche molecolari sono state sviluppate per la rapida identificazione dei miceti direttamente nel flacone per l'emocoltura (10, 11).

Recentemente anche il sistema "MALDI-TOF MS" (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) è stato applicato con successo per l'identificazione di specie di lieviti direttamente da colture di sangue positive, con importanti implicazioni per una appropriata gestione dei pazienti con fungemia (12). Certamente l'introduzione di queste metodiche, rapide e specifiche, ha decisamente migliorato la diagnostica micologica che comunque non può prescindere dall'emocoltura che, secondo le ultime linee guida dell'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) relative alla diagnosi e alla gestione delle malattie da *Candida*, viene considerata una indagine essenziale da eseguire quando possibile, nonostante i problemi connessi (13).

Tra questi di rilevante importanza sono: il numero di prelievi da eseguire e il volume di sangue da prelevare, la fugace permanenza di *Candida* nel circolo sanguigno e infine la specie coinvolta e il sistema utilizzato per la coltura del sangue.

Nelle linee guida dell'ESCMID sono stati ben definiti il numero di prelievi da eseguire (da 2 a 4), il volume di sangue da prelevare (60 ml per l'adulto) e il sistema per l'emocoltura preferibilmente da utilizzare per l'isolamento dei miceti (metodo lisi-centrifugazione) (13). In effetti pare che l'emocoltura avviata mediante metodo lisi-centrifugazione presenti una migliore performance in termini di sensibilità sia per quanto riguarda l'isolamento delle diverse specie di *Candida* ma soprattutto per l'isolamento

di funghi particolarmente esigenti che, anche se raramente, possono essere causa di fungemia (14). Infine, ancor di più che per la colonizzazione, isolare e identificare miceti dal sangue, oltre ad avere importanti ricadute sulla gestione del paziente, consente di conoscere l'epidemiologia locale, che rispetto al dato generale può presentare significative variazioni. In uno studio pilota multicentrico recentemente avviato per rilevare l'epidemiologia di *Candida* in diverse UTI della regione Sicilia è emerso come a fronte di un dato globale che si allinea con la letteratura e che pone *Candida albicans* (44,9%) al primo posto tra le specie isolate dal sangue seguita da *Candida parapsilosis* (28,4%) e *Candida glabrata* (13,8%), ci sono centri nei quali si inverte assolutamente questo dato e la specie più frequentemente isolata dal sangue risulta essere *Candida parapsilosis* (30,9%) seguita da *Candida glabrata* (26,2%) e solo dopo da *Candida albicans* (16,7%) (15). Comunque, per facilitare la diagnosi precoce di IFI, nel tentativo di ridurre l'alta mortalità associata a queste infezioni e per evidenziare tutti quei casi di probabili infezioni non diagnosticabili con i metodi convenzionali, sono state introdotte procedure diagnostiche alter-

Test	Considerazioni	Note/Raccomandazioni
Mannano + anti-Mannano	Determinazione combinata	Raccomandato Possono essere necessari esami seriali. Alto VPN
Altri anticorpi (come Serion ELISA classico)	Dati limitati per candidemia	Non raccomandato
β-D-glucano	Non specifico per <i>Candida</i>	Raccomandato (con Fungitell). Si raccomandano determinazioni seriali (due a sett.). Alto VPN. Non validato nei bambini.
Septifast/Magicplex™	Dati limitati per candidemia	Non raccomandato
In house PCR	No dati di validazione disponibili	Non raccomandato

EFISG - ESCMID Fungal Infection Study Group 2012. Clin Microbiol Infect 18: 9-18.

Figura 3 - Metodi non colturali per diagnosticare una candidemia e/o una candidosi invasiva.

native basate sul rilevamento e la quantificazione di biomarcatori fungini. Nella figura 3 sono riportati tutti i metodi non colturali (13), raccomandati e non raccomandati, per diagnosticare una candidemia e/o candidosi invasiva che rappresenta, in medicina interna, l'infezione fungina opportunistica principalmente rilevata.

In particolare, relativamente alla ricerca degli antigeni fungini, il mannanolo, polisaccaride legato alla parete cellulare di *Candida*, che può essere ricercato nel siero o plasma umano mediante saggio immunoenzimatico (Platelia *Candida* Ag Plus) per la diagnosi della candidosi invasiva, ha trovato meno applicazione nella pratica clinica in seguito alle problematiche connesse soprattutto alla sensibilità. Infatti, è stato dimostrato come la sensibilità del test vari in relazione alle diverse specie di *Candida* coinvolte nell'infezione (più bassa per *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*) e alla presenza di anticorpi anti-mannano. In uno studio in cui è stato valutato l'uso del Platelia *Candida* per la diagnosi di candidosi invasiva in neonati pretermine ricoverati in UTIN (Unità di Terapia Intensiva Neonatale) è stata evidenziata una maggiore sensibilità del test probabilmente per l'assenza di anticorpi anti-mannano in questa tipologia di pazienti (16). Alla luce di queste problematiche, è stata raccomandata, per la diagnosi probabile di candidosi invasiva, la ricerca combinata di antigene e anticorpi anti-mannano in modo da migliorare la performance diagnostica in termini di sensibilità e specificità (17).

La ricerca di altri anticorpi mediante metodi differenti non è stata ancora inserita tra i criteri raccomandati per la diagnosi della candidosi invasiva in seguito alla limitatezza di dati relativi alle candidemie. *Candida albicans* IFA IgG è un test basato sulla rilevazione, mediante saggio di immunofluorescenza indiretta, di anticorpi diretti verso antigeni di superficie del tubulo germinativo di *Candida albicans*. Si tratta di un test rapido e semplice che, in presenza di titolo anticorpale $\geq 1/160$ e in associazione alle condizioni cliniche del paziente, può supportare una diagnosi probabile di candidosi invasiva (18).

È stato inizialmente studiato in pazienti ematologici (19) e recentemente in pazienti critici ricoverati in UTI nei quali è stato dimostrato come titoli positivi sono significativamente associati alla riduzione della mortalità probabilmente per l'inizio di appropriate terapie pre-emptive (20, 21). Inoltre, la ricerca di questi anticorpi è stata usata in combinazione all'antigene (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano, alla proteina C reattiva e alla procalcitonina in pazienti critici non neutropenici con gravi condizioni addominali per discriminare tra lo stato di colonizzazione e quello di infezione in modo da stabilire un modello per la previsione dello sviluppo della candidosi invasiva (22). In particolare è stato dimostrato come livelli di (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano maggiori di 259 pg/ml in associazione a titoli anticorpali posi-

tivi possano discriminare, in questa tipologia di pazienti, tra colonizzazione e candidosi invasiva (22). Proprio per quanto riguarda l'antigene (1→3)-β-D-glucano, componente della parete cellulare di molti funghi ad eccezione di zigomiceti e *Cryptococcus*, è stato ormai incluso tra i criteri internazionali di definizione di micosi invasiva probabile (6).

In commercio sono disponibili per uso diagnostico quattro diversi kit e in Europa il più utilizzato è il Fungitell® con cut-off di positività pari a 80 pg/ml. Pare che non vi sia nessuna considerevole differenza in termini di sensibilità per il rilevamento delle infezioni invasive da *Candida* e da *Aspergillus*, anche se molto spesso viene principalmente utilizzato per la diagnostica delle candidemie e candidosi invasive (23). La caratteristica forse più importante del test è l'alta predittività negativa considerando che ancora non sono stati chiariti né i criteri per la definizione di un risultato positivo né alcune problematiche riguardanti il timing, la frequenza dei prelievi e il cut-off da utilizzare. Probabilmente ciò è conseguenza dei tanti possibili fattori influenzanti la determinazione dell'antigene (1→3)-β-D-glucano tra cui l'emodialisi con membrana di cellulosa, la somministrazione di immunoglobuline o albumina, l'uso di antibiotici, le infezioni batteriche soprattutto da Gram-negativi, l'uso di garze e la severa mucosite (23). È stato comunque evidenziato come, rispetto al cut-off di positività (80 pg/ml) attualmente utilizzato, valori di (1→3)-β-D-glucano superiori a 160 pg/ml sono altamente indicativi di candidemia (24).

Oltre al cut-off, anche il numero di campioni consecutivi positivi può essere un ulteriore parametro da utilizzare per una corretta interpretazione del dato di laboratorio in quanto è stato osservato come, all'aumento del numero di campioni consecutivi positivi corrisponda, al pari della stessa sensibilità, un aumento della specificità (25). Infine, oltre che per uso diagnostico, emerge sempre più il ruolo prognostico di questo antigene il cui decremento, in corso di terapia antifungina, è associato spesso a successo terapeutico (26, 27). In un recente lavoro che valuta la performance dell'(1→3)-β-D-glucano e di una metodica in real-time PCR per la diagnosi di candidosi invasiva è stato evidenziato come nelle candidemie la prestazione diagnostica dell'antigene (1→3)-β-D-glucano sia superiore a quella della real-time PCR che invece presenta una maggiore sensibilità nelle candidosi profonde di organo (28). In effetti, nonostante le metodiche molecolari basate sulla PCR, sia in-house che mediante kit commerciali, non siano ancora state inserite tra i criteri di definizione di infezione fungina invasiva probabile, sempre più spesso vengono utilizzate in associazione ad altre indagini di laboratorio, sia convenzionali che molecolari, al fine di aumentare la sensibilità e specificità diagnostica dei singoli test. In particolare, il primo metodo commerciale utilizzato è stato il LightCycler® SeptiFast Test che consente, attraverso una metodica in real-

time PCR, di identificare nel sangue fino a 25 microrganismi e tra i miceti le cinque specie di *Candida* più frequentemente responsabili di candidemia (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) e *Aspergillus fumigatus*. Il MycAssay *Aspergillus* PCR è un altro kit commerciale utilizzato per la rilevazione qualitativa di DNA di *Aspergillus* da campioni respiratori e da siero come ausilio alla diagnosi di aspergillosi invasiva. Attualmente molte metodiche di PCR in-house, combinate a test diagnostici convenzionali, vengono spesso utilizzate per la diagnosi precoce di IFI. In uno studio condotto su neonati pretermine ricoverati in UTIN, la ricerca del DNA fungino direttamente nella provetta per l'emocoltura con metodo lisi-centrifugazione, ha rappresentato un valido strumento a supporto della diagnosi di candidosi invasiva (29). Tuttavia, diverse problematiche, relative soprattutto alla standardizzazione delle metodiche di estrazione e amplificazione del DNA, devono essere ancora superate affinché i metodi molecolari possano essere utilizzati nella routine diagnostica. In ogni caso, le metodiche molecolari basate sulla PCR, in combinazione ad informazioni microbiologiche e cliniche, hanno l'indiscusso potenziale, non solo di identificare rapidamente e con precisione i patogeni fungini, ma anche di indicare se il patogeno è in grado di rispondere al trattamento antimicotico attraverso il rilevamento di eventuali meccanismi di resistenza.

In conclusione, il ruolo della microbiologia nella diagnosi delle infezioni fungine invasive diventa sempre più strategico in relazione alla tipologia e alle condizioni cliniche del paziente nonché ai campioni clinici che possono essere prelevati per l'esecuzione delle indagini di laboratorio. Nei campioni clinici nei quali la presenza del fungo è indice di infezione, la microscopia e l'isolamento in coltura sono entrambi inderogabili nonostante i limiti evidenziati.

L'esame microscopico per la rapidità diagnostica e per il basso costo, l'isolamento in coltura per le importanti implicazioni epidemiologiche e terapeutiche conseguenti all'identificazione dell'agente eziologico, al rilevamento dei fattori di virulenza e allo studio della sensibilità *in vitro*. Grazie all'introduzione dei metodi non colturali attraverso la ricerca di biomarkers è oggi possibile supportare, in associazione ai dati clinici del paziente, una diagnosi precoce di infezione fungina invasiva che consenta di superare i limiti connessi alla scarsa sensibilità delle colture e alla difficoltà di ottenere campioni biotici non routinariamente prelevabili da pazienti che presentano gravi fattori di rischio.

L'utilizzo di una diagnostica integrata che associ i metodi convenzionali all'uso dei biomarkers, sembra essere un punto di forza per una rapida e accurata diagnosi di infezione fungina invasiva. Infatti, grazie ai progressi compiuti nello studio della patogenesi, all'introduzione di test diagnostici

rapidi e sensibili oggi è possibile stabilire appropriati criteri di selezione dei pazienti da sottoporre ad uno specifico work-up diagnostico che consenta una rapida e precoce diagnosi di malattia fungina invasiva e favorisca l'avvio di una strategia terapeutica diagnostic-driven.

Bibliografia

1. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 309-317.
2. Bassetti M, Taramasso L, Nicco E, Molinari MP, Mussap H, Viscoli C. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care Hospital in Italy. *PLoS ONE*. 2011; 6: e24198.
3. Tortorano AM, Prigitano A, Lazzarini C, Passera M, Deiana ML, Cavinato S, De Luca C, Grancini A, Lo Cascio G, Ossi C, Sala E, Montagna MT. A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection*. 2013; 41: 655-662.
4. Luzzati R, Cavinato S, Giangreco M, Granà G, Centonze S, Deiana ML, Biolo G, Barbone F. Peripheral and total parenteral nutrition as the strongest risk factors for nosocomial candidemia in elderly patients: a matched case control study. *Mycoses*. 2013; 56: 664-671.
5. Bassetti M, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C, Righi E. Candidaemia in internal medicine departments: the burden of a rising problem. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19: 281-284.
6. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, 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: 1813-1821.
7. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 1994; 220: 751-758.
8. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, Garnacho-Montero J, Leon MA. A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med*. 2006; 34: 730-737.
9. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*. 2012; 125: 14-24.
10. Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 5660-5664.
11. Shepard JR, et al. Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 50-55.
12. Yingjun Y, Ying He TM, Criziel Q, Gongyi S, Haijing L, Charles WS, Markus K, Yi-Wei. Improved Identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining sepsityper specimen processing and microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization biotyper system. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 2528-2532.

13. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikian-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al., for the EFISG. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 9-18.
14. Oliveri S, Trovato L, Betta P, Romeo MG, Nicoletti G. *Malassezia furfur* fungaemia in a neonatal patient detected by lysis-centrifugation blood culture method: first case reported in Italy. *Mycoses.* 2011; 54: 638-640.
15. Trovato L, Stimoli F, Imbriani A, Castiglione G, Privitera A, Borraccino A, Ghiraldi E, Marotta A, Baldi MT, Romeo A, Oliveri S. Epidemiologia di *Candida* in Unità di Terapia Intensiva: risultati preliminari di uno studio multicentrico nella regione Sicilia. 41° Congresso Nazionale Società Italiana di Microbiologia. Riassunti pag. 58. In: Bollettino della SIM ottobre 2013.
16. Oliveri S, Trovato L, Betta P, Romeo MG, Nicoletti G. Experience with the Platelet *Candida* ELISA for the diagnosis of invasive candidosis in neonatal patients. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 391-393.
17. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C and 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.
18. Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR, Garcia-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, et al. Evaluation of a new commercial test (*Candida albicans* IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22: 83-88.
19. Garcia-Ruiz JC, del Carmen AM, Regulez P, Quindós G, Alvarez A, Pontón J. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 3284-3287.
20. Zaragoza R, Pemán J, Quindós G, Iruretagoyena JR, Cuetara M, Ramirez P, et al. Clinical significance of *Candida albicans* germ tube antibody detection in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15: 592-595.
21. Pemán J, Zaragoza R, Quindós R, Alkorta M, Cuétara MS, Camarena JJ, Ramirez P, Giménez MJ, Martín-Mazuelos E, Linares-Sicilia MJ, Pontón J. Clinical factors associated with a *Candida albicans* germ tube antibody positive test in intensive care unit patients. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 60.
22. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Castro C, Ubeda A, Loza A, Martín-Mazuelos E, Blanco A, Jerez V, Ballus J, Alvarez-Rocha L, Utande-Vazquez A, Farinas O. Value of β -D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intens Care Med.* 2012; 38: 1315-1325.
23. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β -D-Glucan Assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2011; 52: 750-770.
24. Del Bono V, Delfino E, Furfaro E, Mikulska M, Nicco E, Bruzzi P, Mularoni A, Bassetti M, Viscoli C. Clinical performance of the (1,3)- β -D-glucan assay in early diagnosis of nosocomial *Candida* bloodstream infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18: 2113-2117.
25. Mohr JF, Sims C, Paetznick V, Rodriguez J, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Prospective survey of (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 58-61.

26. Richards EP, Mohammadi S, Forrest GN. 1→3 β-d-glucan: from diagnosis to prognosis. *Current Fungal Infection Reports*. 2013; 1: 15-20.
27. Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L. (1→3)-β-d-Glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012; 55: 521-526.
28. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, Shields RM, Cheng S, Mitsani D, Vadnerkar A, Silveira FP, Kleiboeker SB, Clancy CJ. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, β-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012; 54: 1240-1248.
29. Trovato L, Betta P, Romeo MG, Oliveri S. Detection of fungal DNA in lysis-centrifugation blood culture for the diagnosis of invasive candidiasis in neonatal patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18: 63-65.