

**VALOR DIAGNÓSTICO DEL TÍTULO SEROLÓGICO DEL MANANO DE
CANDIDA Y LA PROTEÍNA C REACTIVA EN PACIENTES CON
NEOPLASIA HEMATOLINFOIDE Y NEUTROPENIA CON FACTOR DE
RIESGO DE CANDIDIASIS INVASIVA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

ANGELICA LUCÍA PACHECO SILVA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Bogotá
2008**

**VALOR DIAGNÓSTICO DEL TÍTULO SEROLÓGICO DE MANANO DE
CANDIDA Y LA PROTEÍNA C REACTIVA EN PACIENTES CON
NEOPLASIA HEMATOLINFOIDE Y NEUTROPENIA CON FACTOR DE
RIESGO DE CANDIDIASIS INVASIVA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

ANGELICA LUCÍA PACHECO SILVA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial
para optar el título de:

BACTERIÓLOGA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Bogotá
2008**

**VALOR DIAGNÓSTICO DEL TÍTULO SEROLÓGICO DEL
MANANO DE CANDIDA Y LA PROTEÍNA C REACTIVA EN
PACIENTES CON NEOPLASIA HEMATOLINFÓIDE Y
NEUTROPENIA CON FACTOR DE RIESGO DE CANDIDIASIS
INVASIVA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA**

ANGELICA LUCIA PACHECO SILVA


Dra. PILAR RIVAS
Micóloga
DIRECTORA


Dra. SONIA CUERVO
Infectóloga
CODIRECTORA

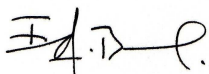

Dr. RICARDO SANCHEZ
Epidemiólogo
ASESOR EPIDEMIOLÓGICO


Dr. LEONARDO ENCISO
Hematólogo
ASESOR CLÍNICO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Bogotá
2008**

**VALOR DIAGNÓSTICO DEL TÍTULO SEROLÓGICO DEL
MANANO DE *CANDIDA* Y LA PROTEÍNA C REACTIVA EN
PACIENTES CON NEOPLASIA HEMATOLINFÓIDE Y
NEUTROPENIA CON FACTOR DE RIESGO DE CANDIDIASIS
INVASIVA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

APROBADO



JURADO

Dr. EDGAR BERNAL

Internista Infectólogo



JURADO

Dra. MELVA LINARES

Bacterióloga Docente

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA**

**Bogotá
2008**

**VALOR DIAGNÓSTICO DEL TÍTULO SEROLÓGICO DE MANANO DE
CANDIDA Y LA PROTEÍNA C REACTIVA EN PACIENTES CON NEOPLASIA
HEMATOLINFOIDE Y NEUTROPENIA CON FACTOR DE RIESGO DE
CANDIDIASIS INVASIVA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

APROBADO


Dra. INGRID SCHULER
Decana Académica
Facultad de Ciencias


Dra. LUZ A. MALDONADO
Directora carrera de Bacteriología

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Bogotá
2008**

NOTA DE ADVERTENCIA

ARTÍCULO 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946:

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en su trabajo de grado”.

DEDICATORIA

Al Amigo que nunca falla...

*A quien hoy se ha convertido
en la luz de mis ojos*

A mi esposo por su inmejorable amor, comprensión y apoyo

*A mi madre, mi padre y hermano por ser un apoyo
durante los periodos de altibajos en esta etapa de mi vida y
mi hermanita por hacer de este camino
educativo más agradable*

*A mis suegros
un apoyo incondicional desde que me conocieron*

*A mis amigos, maestros y jefes
los que siempre me dieron animo para seguir adelante y
quienes sí formaron parte de mi crecimiento profesional y personal.*

Para mí...

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa su agradecimiento a:

Dra. Pilar Rivas.

Micóloga Laboratorio Clínico INC, Bogotá

Dra. Sonia Cuervo.

Infectóloga INC, Bogotá.

Dr. Ricardo Sánchez.

Epidemiólogo INC, Bogotá

Dra. Gina Paola Pardo Gutiérrez.

Bacterióloga PUJ. Bogotá

Dr. Leonardo Enciso.

Hematólogo INC. Bogotá

Dr. Jorge Mesa López.

Patólogo INC, Bogotá.

Dra. Maria Cristina Paredes.

Coordinadora Laboratorio Clínico. INC, Bogotá

TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
2	JUSTIFICACIÓN	16
3	OBJETIVOS	17
4	DISEÑO METODOLÓGICO	18
4.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	18
4.2	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	18
4.3	DEFINICIÓN DE SUJETOS DEL ESTUDIO	18
4.3.1	Población	18
4.3.2	Muestra	18
4.3.3	Criterios de inclusión	19
4.3.4	Criterios de exclusión	19
4.4	VARIABLES Y DEFINICIONES	19
5	MARCO TEÓRICO	24
5.1	ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	24
5.1.1	Género: Candida	24
5.1.2	Estructura antigénica	24
5.2	RESPUESTA INMUNE FRENTE A LOS HONGOS	26
5.3	CANDIDIASIS INVASIVAS (CI)	28
5.4	INCIDENCIA DE LAS CANDIDIASIS EN EL INC	28
5.5	DIAGNÓSTICO	32
5.5.1	Técnica de ELISA para la detección de antígenos de Manano de <i>Candida spp</i>	38
5.6	PROTEÍNA C REACTIVA	36
5.7	CRITERIOS EORTC-MSG	39
6	METODOLOGÍA	41
6.1	TABULACIÓN	41
6.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
6.3	DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LABORATORIO	41

6.3.1	Detección del antígeno Manano	41
6.3.2	Detección de la Proteína C Reactiva	41
6.4	PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO	41
6.4.1	Captación del paciente para el estudio	41
7	RESULTADOS	43
7.1	VARIABLES DEMOGRÁFICAS	43
7.2	VARIABLES CLÍNICAS	43
7.2.1	Estado de enfermedad del paciente	43
7.2.2	Uso de antibióticos y antifúngicos en los pacientes del estudio.	44
7.2.3	Análisis de otras variables clínicas: cirugía, catéter, hiperalimentación y corticoides.	44
7.3	VARIABLES DIAGNÓSTICAS	46
7.3.1	Cultivos y agentes etiológicos aislados	46
7.3.2	Proteína C-Reactiva	46
7.3.3	Prueba antigénica de Manano para <i>Candida spp</i>	47
7.3.3.1	Asociación títulos la prueba antigénica de de Manano para <i>Candida spp</i> y PCR.	48
7.3.3.2	Asociación títulos de Manano, cultivo microbiológico, histopatológica e imágenes diagnósticas	48
7.4	Supervivencia de los pacientes del estudio durante la estancia hospitalaria	49
7.4.1	Supervivencia durante la estancia hospitalaria	49
7.4.2	Función de supervivencia de Kaplan – Meier	49
7.5	Diagnóstico de infección fúngica invasiva según los criterios de la EORTC-MSG	50
8	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
9	CONCLUSIONES	56
10	RECOMENDACIONES	57
	REFERENCIAS	58
	ANEXOS	64

TABLA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	Lista de variables y sus definiciones. 19
Tabla 2	Características de las principales especies de <i>Candida</i> diferentes a <i>C. albicans</i> causantes de IFI. 26
Tabla 3	Criterios de selección en los pacientes con riesgo de IFI tipo Candidiasis. 40
Tabla 4	Variables demográficas de los pacientes del estudio. 43
Tabla 5	Variables clínicas de los pacientes del estudio. 44
Tabla 6	Uso de Antibióticos y antifungicos en los pacientes del estudio 45
Tabla 7	Asociación causal entre las variables: cirugía, catéter, hiperalimentación, corticoterapia y la supervivencia de los pacientes del estudio al día 30. 45
Tabla 8	Agentes etiológicos aislados, cultivos microbiológicos y su frecuencia en los pacientes del estudio. 46
Tabla 9	Determinación de títulos antigénicos de Manano 47

y su frecuencia en los pacientes del estudio.

Tabla 10	Asociación entre títulos del Antígeno Manano y PCR en los pacientes del estudio.	48
Tabla 11	Supervivencia de los pacientes durante la estancia hospitalaria.	49
Tabla 12	Variables de los pacientes del estudio con títulos antigénicos de manano de <i>Candida</i> positivos	51

TABLA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Principales componentes del micelio y la levadura de <i>Candida albicans</i> de utilidad diagnóstica en las Candidiasis Invasivas.	25
Figura 2	Respuesta inmune frente a los hongos.	28
Figura 3	Esquema de acción de la prueba de ELISA para la detección del antígeno manano de <i>Candida spp.</i> Platelia®.	38
Figura 4	Función de supervivencia según los títulos antigénicos del manano.	47
Figura 5	Función de supervivencia contra el tiempo en riesgo.	49

TABLA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 Datos de la PCR en los pacientes del estudio	42
Gráfico 2 Porcentaje de los criterios diagnósticos según la EORTC/MSG en los pacientes del estudio.	50

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Criterios EORTC	59
Anexo 2 Información kits determinación del antígeno Manano de <i>Candida spp</i> Biorad	62
Anexo 3 Medios de cultivo componentes y preparación.	64
Anexo 4 Formato de recolección de datos de los pacientes del estudio.	65

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento en la incidencia de las Candidiasis Invasivas (CI) sigue siendo la mayor complicación asociada con la morbilidad y mortalidad de los pacientes con patologías hematolinfoides; es un serio problema en el área clínica, sobre todo en aquellos pacientes que tienen como factor de riesgo neutropenia prolongada y quimioterapia antineoplásica, además, el diagnóstico que se realiza utilizando la historia clínica, las imágenes diagnósticas, las biopsias y los cultivos microbiológicos no son ni suficientes ni oportunos para definir la patología infecciosa del paciente.

El diagnóstico temprano de las CI ofrece muchas dificultades; lo cierto es que la tasa de positividad del hemocultivo y otros medios de cultivo para *Candida spp* es baja. Actualmente se están utilizando diversos métodos serológicos para su diagnóstico, el más conocido es la detección de antígenos como el Manano. Los estudios donde se establece la utilidad de esta prueba diagnóstica han determinado que dicha prueba puede mejorar y complementar el diagnóstico de las CI de forma precoz de una manera rápida y eficiente, sobre todo en aquellos pacientes con malignidades hematológicas. Este estudio tiene como finalidad establecer la utilidad diagnóstica de la detección de los títulos serológicos de antígenos de Manano de *Candida spp* y la Proteína C Reactiva para el diagnóstico temprano de las CI en pacientes con neoplasias hematolinfoides.

2. JUSTIFICACIÓN

El tiempo prolongado para el diagnóstico, la baja sensibilidad y especificidad en la recuperación e identificación de los agentes etiológicos responsables de las infecciones fúngicas invasivas (IFI), es lo que ha hecho que se busquen nuevas herramientas no invasivas para poder facilitar el diagnóstico de las mismas, disminuyendo el tiempo en el reporte y aumentando tanto la especificidad como la sensibilidad de las pruebas; por esta razón actualmente hay un incremento en la

investigación y desarrollo de diversas maneras de detección serológica que permitan un diagnostico claro y eficaz de estas infecciones.

Una de las herramientas de ayuda clínica para el diagnóstico de las CI es el determinar la presencia de antígenos de Manano de *Candida*, esta es una prueba que sirve como guía para el diagnóstico de la infección sobre todo en aquellos pacientes con alto riesgo ya sea por su patología de base o su tratamiento asociado entre otras.

3. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la utilidad clínica de la detección del antígeno Manano y PCR en el diagnóstico de las CI en pacientes con neoplasias hematolinfoides del Instituto Nacional de Cancerología.

ESPECÍFICOS.

Describir las características demográficas y clínicas de los pacientes.

Medir los títulos séricos de la PCR de estos pacientes durante el periodo de neutropenia.

Medir por medio de la técnica inmunoenzimática tipo doble sándwich (ELISA) los títulos séricos de antígeno Manano presentes en las muestras de sangre en los pacientes del estudio.

Evaluar la relación entre los resultados de Manano y PCR, con el desenlace clínico de los pacientes.

Correlacionar pruebas diagnósticas como el antígeno de Manano, la PCR, el cultivo microbiológico, los hallazgos histopatológicos, junto con las imágenes diagnósticas y los criterios de la EORTC.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un estudio observacional descriptivo de serie de casos de pacientes con neoplasias hematolinfoides y neutropenia con factor de riesgo de adquirir Candidiasis Invasiva.

4.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Existe relación entre la variación de los títulos de Manano y PCR?
2. ¿Existe relación entre el desenlace clínico y los niveles séricos de Manano y PCR?

4.3 DEFINICIÓN DE SUJETOS DE ESTUDIO

4.3.1 Población

POBLACIÓN BLANCO: Pacientes con neoplasias hematolinfoides que ingresen al área de hospitalización en el servicio de hematología y oncología del Instituto Nacional de Cancerología E.S.E (INC).

POBLACIÓN DE ESTUDIO: Pacientes de la población blanco diagnosticados con alguna neoplasia hematolinfoide y que se encuentren neutropénicos durante el periodo de hospitalización.

4.3.2 Muestra

De un total de 103 pacientes, hospitalizados en el servicio de hematología y oncología del INC entre el periodo de Abril a Agosto del 2007, se seleccionaron un total de 35 pacientes que cumplieron con los criterios de elegibilidad definidos a continuación.

4.3.3 Criterios de inclusión

Pacientes que ingresen al servicio de hematología y oncología del INC con la siguiente condición: Diagnóstico de una neoplasia hematolinfoide, con neutropenia y con riesgo de infección fúngica invasiva (IFI) según los criterios de la EORTC-MSG.

4.3.4 Criterios de exclusión

No disponibilidad de historias clínicas para recuperar las variables que se miden en el estudio.

4.4 VARIABLES Y DEFINICIONES

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO	NIVEL OPERATIVO
Prueba para la detección del antígeno Manano de <i>Candida spp</i>	La detección del antígeno Manano de <i>Candida</i> es una técnica inmunoenzimática en un tiempo, de tipo sandwich en microplaca, que permite la detección cuantitativa y semicuantitativa del antígeno manano circulante en suero humano.	Numérica	(ng/dl)
Interpretación de la prueba antigénica	<p>Cálculo del Índice: Para cada suero ensayado calcular la relación: I: DO muestra / Valor umbral</p> <p>Este cálculo permite limitar las variaciones de DO Inter.-ensayos en Inter-laboratorios debidas a las diferentes condiciones de realización de la reacción inmunoenzimática (temperatura, ambiente, modos de lavado, etc.)</p>	Nominal	<p>NEGATIVO (N) < de 0.25 ng/dl</p> <p>INTERMEDIO (I) Entre 0.25 y 0.5 ng/dl</p> <p>POSITIVO (P) > de 0.5 ng/dl</p>

Infección Fúngica Invasiva SEGÚN CRITERIO EORTC	Se presentan en individuos inmunocomprometidos. En la mayoría de los casos el hongo ingresa por inhalación y desde el pulmón, se disemina por vía hemática a cualquier otro órgano o sistema.	Nominal	Tumor sólido Leucemia Linfoma Otros tumores
Infección Fúngica Probada SEGÚN CRITERIO EORTC	Hallazgo de hongos en sangre o en un sitio normalmente estéril con un cultivo o examen directo; Independiente de factores predisponentes en el hospedero o elementos clínico-radiológicos.	Nominal	Oncología y Hematológica hospitalizados
Infección Fúngica Probable SEGÚN CRITERIO EORTC	Debe presentar al menos un criterio de cada uno de los factores como son: <ul style="list-style-type: none"> • Factores predisponentes en el hospedero • Elementos clínicos sugerentes, un estudio micológico positivo no definitorio. • Cultivo positivo de sitio no estéril. 	Nominal	Oncología y Hematológica hospitalizados
Infección Fúngica Posible SEGÚN CRITERIO EORTC	Debe presentar al menos un criterio de los factores, ya sean factores predisponentes ó elementos clínico-radiológicos ó la micología.	Nominal	Oncología y Hematológica hospitalizados

NEUTROPENIA FEBRIL PROLONGADA	Paciente con conteo de neutrófilos < a 500 x mm ³ con persistencia de fiebre > 38,3 °C por más de 96 horas después de iniciado cubrimiento antibiótico de amplio espectro en el que se espera > de 10 días de neutropenia.	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
ESTANCIA HOSPITALARIA	Días de hospitalización hasta al momento que el paciente se da de alta	Razón	Numero de Días
MORTALIDAD	Cualquier causa de muerte durante la estancia hospitalaria de un paciente incluido en el estudio	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO: LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	Trastorno mieloproliferativo caracterizado por el crecimiento neoplásico de las células principalmente mieloide en la médula ósea y su aumento extremo en la sangre periférica	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO: LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA	Trastorno linfoproliferativo caracterizado por el crecimiento neoplásico de las células principalmente linfoides en la médula ósea y su aumento extremo en la sangre periférica	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO: LINFOMA	Proliferación maligna de linfocitos. La mayor parte de los casos se origina en los ganglios linfáticos, pero puede iniciarse en muchos sitios extraganglionares.	Nominal	Presente (1) Ausente (0)

TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSEA	Procedimiento realizado por el servicio de hematología que introduce células con potencial de repoblar medula ósea tras una terapia ablativa quimioterapéutica.	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
CORTICOTERAPIA PROLONGADA	Uso de corticoides que creen una depleción de leucocitos y no permitan una respuesta inmune contra hongos. (3)	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
USO DE ANTIBIOTICO-TERAPIA	Antibioticoterapia de alto espectro por tiempo mayor a 2 semanas. Cefepime.	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
ÍNDICE DE COLONIZACIÓN > 0,5	Numero de aislamientos positivos de especies micóticas dividido el numero total de sitios cultivados en búsqueda de <i>Candida spp</i>	Nominal	- >0 - 0.5 - < 0.5
NUTRICIÓN PARENTERAL	Uso de alimentación parenteral por cualquiera de sus indicaciones	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
EDAD	Numero de años del paciente	Nominal	Años al momento de la recolección de datos
SEXO	Genero biológico	Razón	Masculino (1) Femenino (0)
ANTIFÚNGICOS	Medicamentos antimicrobianos con efecto terapéutico sobre hongos	Nominal	Citarabina Fluconazol Anfotericina B Itraconazol Voriconazol Caspofungina Otros

CIRUGIA ABDOMINAL	Antecedente de procedimiento quirúrgico o reciente que compromete el tracto gastrointestinal.	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
PROTEINA C REACTIVA	Proteína de fase aguda que se sintetiza en el hígado, la cual es un marcador inespecífico que se eleva durante la respuesta inmune a infecciones, daños a tejidos o necrosis celular	Nominal	(mg/dl)
DESCENLACE CLINICO DEL PACIENTE	Estado vital al momento del egreso: vivo o muerto ocurrido durante los primeros 30 días luego de la sospecha de Candidiasis Invasiva	Nominal	Presente (1) Ausente (0)

Tabla 1. Lista de variables y sus definiciones. El autor

5. MARCO TEÓRICO.

5.1 ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

5.1.1 Género: *Candida*

En el género *Candida* hay muchas especies que pueden causar Candidiasis, estas son flora normal en el hombre ya que se encuentran en la piel, las mucosas y el aparato gastrointestinal; pueden colonizar al hombre poco después del nacimiento aunque hay registros de que también en el periodo de gestación se puede presentar la infección por este género. Las Candidiasis son las micosis sistémicas en el hombre y los agentes mas comunes involucrados en la infección son: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis*.
(4)(11)(32)(37)

Las Candidas crecen en medio de cultivo o tejido como levaduras ovales en gemación con un tamaño entre 3 a 10 micrómetros, forman pseudohifas cuando estas continúan su crecimiento pero estas no se desprenden generando células alargadas constreñidas en los tabiques de la célula.

Dentro de este género se encuentra la *C. albicans* que es un hongo pleomórfico ya que además de levadura produciendo pseudohifas también puede producir hifas verdaderas, esto sucede cuándo en medio de agar se dejan crecer a temperatura de 37°C durante 24 horas esta crece en forma de levadura creando colonias de color crema de textura blanda y estas pseudohifas se observan en el medio de cultivo con crecimiento hacia abajo; esta es una prueba común para la diferenciación de a especie mas patógena de las candida que es la *C. albicans*; después de una incubación en suero por casi 90 minutos a 37°C las células de la *C. albicans* empiezan a generar verdaderas pseudohifas llamadas tubo germinal y en un medio enriquecido lo suficiente produce clamidiosporas grandes y esféricas. Se pueden emplear pruebas como la fermentación y

asimilación de carbohidratos para confirmar la identidad de la especie.
(32)

5.1.2 Estructura antigénica

La pared celular es la estructura más externa de *Candida spp* y contiene un gran número de antígenos capaces de estimular potentes respuestas inmunológicas. Entre todos los antígenos de la pared celular debemos resaltar, por su interés diagnóstico, el Manano, un polisacárido muy abundante en las levaduras y los micelios de *C. albicans* y un antígeno de alto peso molecular (>260 kDa) que es específico del micelio.

La estructura del Manano es compleja y está constituida por unidades de manosa que forman cadenas centrales largas unidas entre si por enlaces α -16 y cadenas laterales cortas de unidades de manosa unidas entre si por enlaces β -1 \rightarrow 2 y α -1 \rightarrow 2. Por ultimo, los componentes no antigénicos que se liberan durante la infección y que pueden ser de utilidad diagnóstica incluyen el D-arabinitol, el β -1 \rightarrow 3 glucano y el ADN (Figura 1). (3,4)

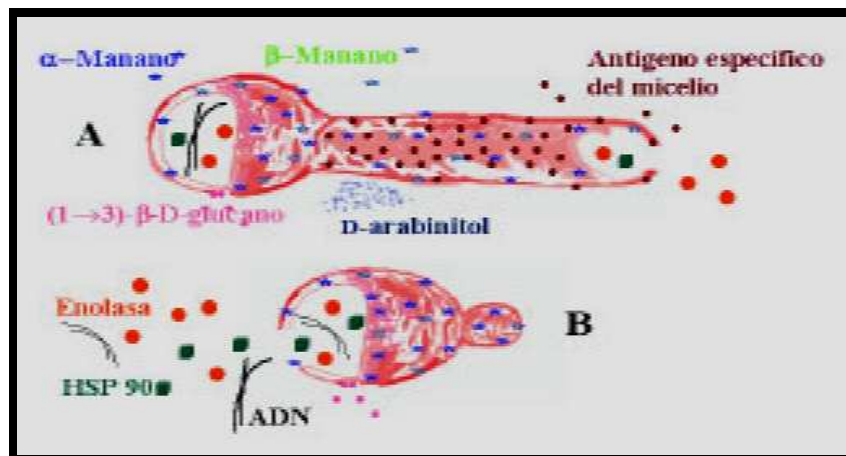


Figura 1. Principales componentes del micelio (A) y la levadura (B) de *C. albicans* de utilidad en el diagnóstico

serológico de las Candidiasis Invasoras. (Jose Pontón. Microbiological non-culture methods for the diagnosis of invasive candidiasis: usefulness of surrogate markers. Rev Iberoamericana Micología. 2006)

Género / especie	Características	Factores de riesgo
<i>C. krusei</i>	Fungemia en pacientes con Cáncer	Leucemia, TCMH, neutropenia
<i>C. glabrata</i>	Candidemia en pacientes con Cáncer	Tumor sólido, cirugía abdominal
<i>C. parapsilosis</i>	Candidemia en pacientes con Cáncer	Catéter intravascular
<i>C. lusitanae</i>	Candidemia en pacientes con Cáncer	Neoplasia hematológica, neutropenia, TCMH, quimioterapia
<i>C. guilliermondii</i>	Fungemia en pacientes con Cáncer	Cáncer, TCMH, TAMO, neutropenia
<i>C. tropicalis</i>	Candidemia en pacientes con Cáncer	Lesiones. Neutropenia, mucositis
<i>C. dubliniensis</i>	Candidiasis orofaríngea	Mucositis y lesiones orofaríngeas

Tabla 2. Características de las principales especies de *Candida* distintas a *C. albicans* causantes de IF. Peter G Pappas MD. Invasive Candidiasis. Infectious Diseases Clinics of America. 20 (2006) 485-506

5.2 RESPUESTA INMUNE FRENTE A LOS HONGOS

Recientemente se ha observado un aumento de las infecciones fúngicas oportunistas asociado al incremento del número de inmunodeficiencias causadas principalmente por el SIDA y por el tratamiento del cáncer diseminado y el rechazo trasplantes, que inhiben la función de la médula ósea y anula la respuesta inmune. Los diferentes hongos que infectan al ser humano pueden vivir en los tejidos extracelulares o en el interior de los fagocitos; por tanto las respuestas inmunitarias frente a ellos suelen ser combinaciones de las inducidas por las bacterias intracelulares y extracelulares. Sin embargo la inmunidad antimicótica casi no se conoce al contrario que la dirigida contra las bacterias y los virus. Esta falta de

conocimientos se debe en parte a la escasez de modelos animales de micosis y en parte al hecho de que estas infecciones afectan a pacientes incapaces de desarrollar una respuesta inmune adecuada en contra de estos agentes patógenos. (3)(32)(33)(40)

Los principales mediadores de la inmunidad innata frente a los hongos son los neutrófilos y los macrófagos. Los pacientes con neutropenia son muy susceptibles a las infecciones micóticas oportunistas. Es probable que los neutrófilos liberen sustancias fungicidas, tales como los intermediarios reactivos del oxígeno durante el estallido respiratorio y enzimas lisosómicas para que pueda desarrollarse su descomposición intracelular y de esta manera tener el antígeno preparado para su posterior presentación. La inmunidad celular es el mecanismo más importante de la inmunidad adaptativa frente a las infecciones por hongos. (3)(32)(40)

Las infecciones por *Candida* suelen comenzar en las superficies de las mucosas; la inmunidad celular evita la propagación de los hongos a los tejidos por medio de la fagocitosis, el estallido respiratorio y el complemento por dos de sus tres vías, la clásica y la alterna. En todos los casos las respuestas Th1 protegen al huésped, mientras que las Th2 son lesivas.

A menudo gracias a estas respuestas los hongos provocan respuestas de anticuerpos específicos, que son útiles para el diagnóstico serológico; sin embargo, no se ha confirmado que la inmunidad humoral proporcione una protección eficaz. La base de la resistencia a la Candidiasis es compleja y aún no entendida por completo. La respuesta inmunitaria medida por células CD4 + es importante en el control de las candidiasis mucocutánea y los neutrófilos probablemente son decisivos para la resistencia a la

candidiasis sistémica. (3)(32) (40)

Un factor que puede llevar a la incidencia en la tolerancia contra el agente etiológico tipo *Candida spp*, puede ser la respuesta generada por las células T-reg. (40)

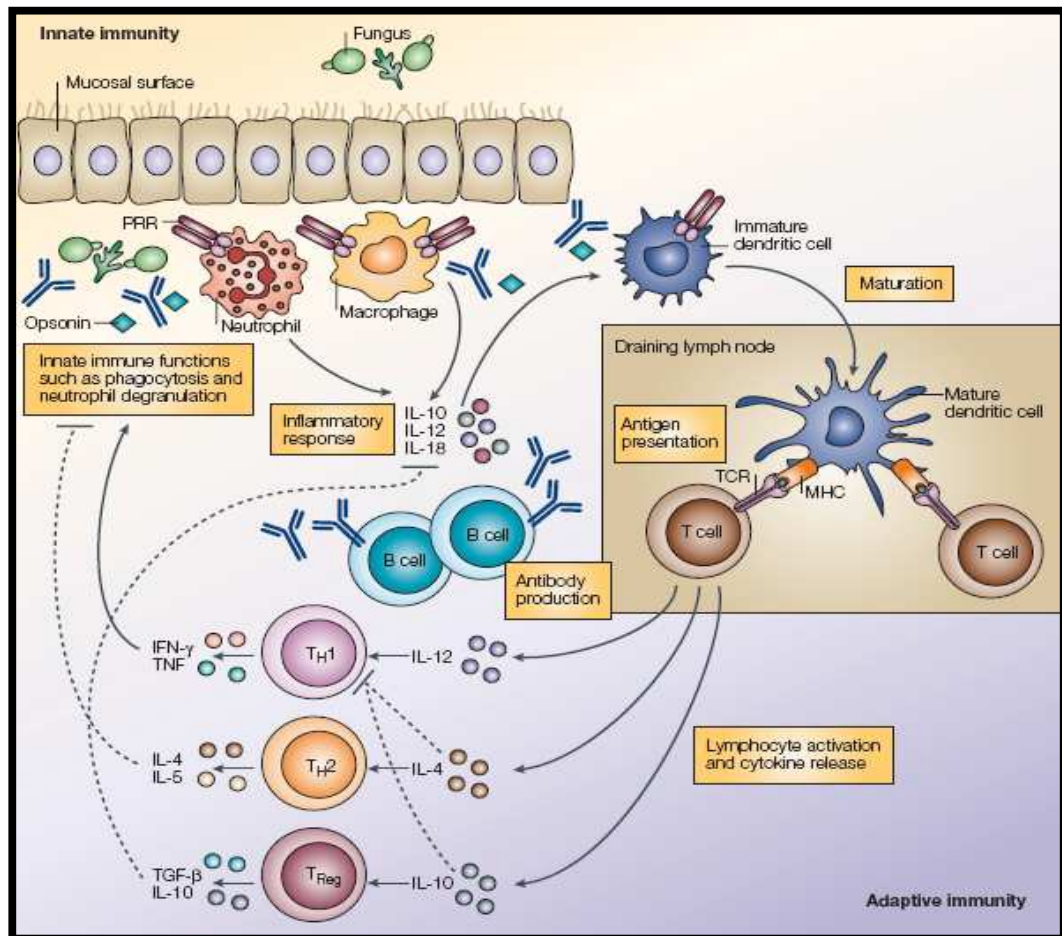


Figura 2. Balance, protección e inmunopatología en las infecciones fúngicas: cooperación entre la inmunidad innata y adaptativa. Luigina Romani. Nature Reviews. Immunology. Volumen 4. Enero 2004

5.3 CANDIDIASIS INVASIVAS

La Candidiasis Invasivas (CI) son infecciones oportunistas causadas por

diferentes especies del género *Cándida*, la afección puede ser aguda o crónica, superficial o profunda y presenta diferentes manifestaciones clínicas. Algunas especies de *Cándida* forman parte de la flora normal de la mucosa del tracto gastrointestinal y genito urinario del hombre y animales de sangre caliente *C. albicans* es la más frecuente, pero en menor proporción otras especies tales como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, y *C. guilliermondii*, se han aislado en procesos patológicos; la fuente principal de la infección es el paciente mismo (endógeno) (1-4) (11) (Anexo 1).

Los factores demográficos, salvo las edades extremas, no tienen mayor importancia. Factores predisponentes los que favorecen el cambio del hongo de comensal colonizador e invasor.

- *C. albicans* infección endógena
- Salas de cirugía
- Manos del personal o fómites (exógeno)
- Portadores del personal hospitalario
- La producción de fungemia se facilita por translocalización intestinal (sin solución de continuidad)
- Infección de catéteres y prótesis
- A través de la piel inmadura (neonatos)
- A partir de infecciones urinarias bajas

Antiguamente *C. albicans* era la especie más frecuente, hoy en día se observa una disminución porcentual a favor de otras especies:

- *C. tropicalis*: Asociada con sepsis por colonización de catéteres.

- *C. parapsilosis*: Alimentación parenteral = intrahospitalarias
- *C. krusei* y *C. lusitaneae* y otras especies, en lesiones graves asociadas a infecciones oncohematológicas

El cambio de especies se ha visto inducido por factores predisponentes:

- Uso irracional de antifúngicos
- Aparición de resistencias secundarias a los antifúngicos

Las CI pueden ocurrir tanto en el ambiente de hospitalización como en el servicio quirúrgico, pero aproximadamente la mitad de los casos ocurre durante la estadía en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI); dependiendo del peligro en el hospital para adquirir la infección nosocomial la tasa de mortalidad atribuible a las CI esta en un rango entre el 40 y el 60%. Las dificultades para el establecimiento de un diagnóstico temprano y específico de la infección por *Candida spp* es la mayor razón por la cual ocurren las diversas muertes y enfermedades graves en los pacientes que se encuentran hospitalizados (2) (11).

Infecciones fúngicas como las CI causadas por las diversas especies de *Candida spp* se han ido incrementando, no solo estas asociadas con la muerte en el ambiente hospitalario (40-60%) sino con el elevado costo al que lleva en hospital el cuidado medico y farmacológico. Hay que tener en cuenta que aunque las candidiasis generalmente son causadas por la especie *C. albicans*, también se presenta asociación patológica con otras especies no *C. albicans*; esto representa un problema ya que las manifestaciones patológicas son parecidas para todas las especies y el tratamiento para cada una de ellas debe ser distinto. (2-4) (6) (7)

Los pacientes con CI generalmente presentan un síndrome séptico agudo

que es indistinguible de una bacteriemia pero también puede manifestar una fiebre de origen indefinido, el mayor factor de riesgo para una CI incluye los catéteres intravasculares, alimentación parenteral, inmunodeficiencias, pacientes en periodos muy largos de hospitalización, pacientes en la Unidad de Cuidados Intensivos o pacientes con tratamiento inmunosupresivo por trasplante o con una enfermedad autoinmune o inmunodeficiente de base.(3)(40)

Según un estudio se demostró que los pacientes quienes estaban en mayor riesgo de una infección invasiva por *Candida spp* es la edad; que con un nivel de significancia del $p \leq 0.05$ tenían en el estudio una P de 0.003 en pacientes mayores de 65 años; luego se encontraban los pacientes neutropénicos menor de $3000/\text{mm}^3$ febriles con una P de 0.0184, luego los pacientes con terapia inmunosupresora con una P de 0.0201 (3).

Desde que Elek y Conen demostraron en 1957 que un cuerpo extraño reducía significativamente el número de bacterias requeridas para producir infección, el inherente incremento de la susceptibilidad en los servicios médicos y sus equipos se han ido incrementando significativamente. La tecnología moderna ha propuesto para el servicio médico el uso de materiales que no permitan la infección por parte de estos a los pacientes. (6)

La mitad de las enfermedades nosocomiales están asociadas a material de uso clínico y su mal uso puede ser desastroso porque esta incluido dentro de los posibles factores de riesgo para una infección tanto local como sistémica en los pacientes y para poder eliminar la patología en el paciente no solo basta con la eliminación del factor causante sino de un

tratamiento que puede durar mucho tiempo lo que representa para el hospital un aumento en el gasto económico para el tratamiento. (7)(19)

Numerosas publicaciones se han enfocado en las infecciones asociadas a microorganismos como bacterias pero las infecciones causadas por las diversas especies de *Cándida* que son las que usualmente están presentes en los servicios médicos y en los equipos que son utilizados es estos. Aunque se describen con creciente frecuencia infecciones producidas por los más diversos organismos fúngicos la mayoría de las infecciones siguen siendo por hongos como *Malassezia*, *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*; estos tres últimos agentes están asociados a infecciones invasoras con un mal pronóstico, en parte debido a las enfermedades subyacentes que predisponen a estas micosis y en parte a la mortalidad directa asociada a la acción patógena de estos microorganismos. (7)(19)

La aparición de Candidiasis por otras especies como *C. dubliniensis* o la emergencia de especies que anteriormente eran aisladas con menor frecuencia en hemocultivos como *C. krusei* o *C. glabrata*, han propiciado el desarrollo de métodos de estudio in-vitro de la sensibilidad de los antifúngicos y de unas aproximaciones terapéuticas mas racionales.

Por otra parte, también se ha comprobado que el diagnostico precoz y la instauración de un tratamiento temprano de las CI van asociados a un mejor pronóstico en el paciente.

5.4 INCIDENCIA DE LAS CI EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA (INC)

En el INC las infecciones micóticas asociadas a levaduras ocupa el tercer puesto de los aislamientos clínicos microbiológicos (donde la *C. albicans*

ocupa el primer puesto), después de los cocos Gram positivos y de los bacilos Gram negativos y las infecciones asociadas a los miceliales aun sigue siendo pobremente diagnosticadas, según datos epidemiológicos obtenidos de los grupos de infectología y microbiología. (Informe verbal Dra Pilar Rivas).

5.5 DIAGNOSTICO DE LAS CI.

El incremento en la incidencia de las Candidiasis Sistémicas o Invasivas junto con otras micosis sistémicas es un serio problema en el área clínica, además el diagnostico de las Candidiasis es muy frecuente y sigue teniendo muchas dificultades; lo cierto es que la tasa de positividad del hemocultivo y otros medios de cultivo para *Candida spp* es muy baja y un titulo de anticuerpos en pacientes con problemas hemato-oncológicos son muy bajos casi imperceptibles para las técnicas de detección de los mismos; además el diagnostico del medico durante la revisión del paciente no es suficiente ya que las Candidas pueden generar respuestas inmunes variadas en el huésped. (1)(2)

Para el diagnóstico de las CI diversos métodos han sido utilizados como: detección de antígenos como el Manano, glicoproteínas y otras proteínas antigénicas en el suero de pacientes, pero la detección inmunológica de los diversos antígenos no han sido probados que funcionen exitosamente en el ámbito clínico debido a la baja sensibilidad y especificidad de estas pruebas diagnósticas (1).

El diagnóstico microbiológico es un paso esencial en el establecimiento de la etiología de las enfermedades infecciosas y aunque sus características esenciales es la identificación del agente etiológico, en la

actualidad incluye también la determinación de la sensibilidad in-vitro a los antimicrobianos y la utilización de métodos de tipificación que permitan la diferenciación específica de los aislamientos, siempre que sea posible la identificación de los aislamientos fúngicos debe realizarse a nivel de especie, ya que esta información puede ser muy importante para orientar el tratamiento antifúngico hasta que se dispongan los resultados de sensibilidad invitro. (2)(4)

En el diagnóstico micológico se están produciendo avances importantes que están permitiendo un diagnóstico mas rápido y eficiente, la velocidad en la obtención de este diagnóstico es un aspecto fundamental en la medicina actual; ya que un diagnóstico rápido posibilitara la prescripción de un tratamiento antifúngico específico que permitirá un uso racional de los antifúngicos y limitará el desarrollo de resistencias, así, en pacientes ambulatorios los resultados diagnósticos se necesitan en tiempo real (menos de 10 días), ya que el paciente dejar la consulta con el tratamiento y no volverá a una nueva consulta hasta 10 días después; mientras que en pacientes hospitalizados los resultados diagnósticos serán necesarios lo mas antes posible, aunque el establecimiento de una terapia empírica permitirá disponer de más tiempo para realizar el diagnóstico (1).

Las principales limitaciones de las técnicas microscópicas son su relativamente baja sensibilidad, su incapacidad, en la mayor parte de los casos, para identificar el hongo a nivel de especie y la imposibilidad de realización de estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Existe una amplia experiencia en la utilización de técnicas serológicas en el diagnóstico de la micosis, invasoras mas importantes. Las técnicas serológicas permiten la detección tanto de antígenos fúngicos como de la

respuesta de anticuerpos que se producen durante el desarrollo de la micosis y aunque normalmente se utilizan de forma independiente existen evidencias recientes de que su utilización combinada puede aumentar la sensibilidad del diagnóstico de las CI.

La detección de anticuerpos es de utilidad en el diagnóstico de las CI, Aspergilosis bronco pulmonar, alérgica, aspergiloma, blastomicosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis, y requiere de funcionamiento apropiado de la respuesta humoral por lo que se suele utilizar el diagnóstico en pacientes inmunocompetentes sin embargo, si se utilizan técnicas lo suficientemente sensibles, es posible detectar niveles de anticuerpos de utilidad diagnóstica en algunos pacientes inmunocomprometidos con Candidiasis Invasiva. En la mayoría de las micosis se esta mejorando el diagnóstico basado en la detección de anticuerpos con la utilización de antígenos recombinantes ya que estas aumenta la especificidad de las pruebas al disminuir las reacciones cruzadas con la detección de anticuerpos antimicelio. (2).

Con independencia de la técnica utilizada existe consenso sobre la utilidad de la determinación de títulos de anticuerpos en muestras seriadas ya que facilita el diagnóstico y permite realizar un seguimiento de la evolución del paciente. La detección de antígenos fúngicos puede permitir un diagnóstico temprano de las micosis invasoras ya que, a diferencia de la detección de la respuesta de anticuerpos no necesita el tiempo de inducción a la respuesta inmune y su detección no se ve influenciada por el estado inmunológico del paciente; la detección de antígeno capsular en pacientes con meningitis criptococcica es la prueba modelo de detección de antígeno debido a su rapidez (10-15 min.) sencillez, técnica y especificidad. (4)

La detección del antígeno en pacientes con CI continúa en desarrollo y se ha comercializado un ELISA para la detección de Manano que presenta una buena especificidad pero una baja sensibilidad. Un aumento de la sensibilidad puede lograrse mediante la detección combinada de Manano y anticuerpos anti-Manano. El D-arabinitol es un metabolito producido por *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida kefyr* que puede ser detectado en pacientes con Candidiasis Invasiva mediante cromatografía de gases o mediante un método enzimático comercializado. (4)

El primero de los antígenos detectados en el diagnóstico serológico de las CI fue el Manano. Este antígeno presenta una serie de características que deben de tenerse en cuenta en los estudios serológicos. En primer lugar, es un polisacárido que se encuentra en la pared celular de la mayoría de las especies del género *Candida* de importancia médica, aunque la capacidad de detección de este antígeno en diferentes especies es variable debido a su diferente contenido en Manano; además, aunque normalmente se encuentra formando complejos con los anticuerpos anti-Manano presentes en el suero de la mayoría de las personas, su naturaleza polisacárida permite la disociación de estos complejos utilizando enzimas proteolíticas o calentamientos que destruyen los anticuerpos y dejan libre el Manano para ser detectado.

Por último, el Manano es eliminado rápidamente de la circulación, por lo que se hace necesario el estudio de muestras seriadas de un mismo paciente para aumentar sus posibilidades de detección. Los estudios iniciales realizados con pruebas experimentales desarrolladas en laboratorios de investigación demostraron que la detección de Manano en pacientes con CI permite un diagnóstico específico pero poco sensible,

debido a la corta duración de la mananemia (hasta 2 semanas). La mayoría de los trabajos se han realizado en pacientes neutropenicos con enfermedades hematológicas o en grupos mixtos que incluyen pacientes hematológicos y pacientes quirúrgicos. Recientemente se ha publicado que la detección de Manano en LCR puede ser útil en el diagnóstico de la meningitis por *Candida*. (4).

El aumento de la especificidad del diagnóstico serológico de las CI también se ha intentado utilizando antígenos de la fase micelial de *C. albicans*, ya que la fase micelial facilita la penetración del hongo en los tejidos y por tanto, los anticuerpos contra los antígenos de esta fase morfológica podrían ser un marcador de la invasión tisular.

La utilización de los antígenos purificados específicos de la fase micelial de *C. albicans* puede ser la base del desarrollo de nuevas pruebas serológicas Laín et al. Han utilizado el antígeno recombinante Hwp1 de la pared celular de *C. albicans* en un ELISA para detectar la presencia de anticuerpos en pacientes con Candidiasis Invasivas. En este estudio se obtuvo una sensibilidad del 88,9%, y una especificidad del 82,6% en el diagnóstico de las CI, sin tener que adsorber el suero para eliminar los anticuerpos anti-Manano (4). En los últimos años se están realizando avances importantes en la detección de marcadores séricos de la CI diferentes de los antígenos y anticuerpos. Entre ellos debemos destacar el D-arabinitol y el (1→3)-b-D-glucano. El D-arabinitol es un metabolito producido por *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida kefyr* que puede detectarse utilizando cromatografía de gas-líquido en el suero y orina de pacientes con CI, aunque requiere técnicas complejas que hacen su detección poco práctica, puesto que se han detectado niveles elevados de D arabinitol en pacientes con insuficiencia

renal y el D-arabinitol se aclara por los riñones al mismo ritmo que la creatinina, la proporción arabinitol/creatinina corrige las variaciones en el suero de D-arabinitol debidas a la función renal. Es posible diferenciar el arabinitol producido por *Candida* del arabinitol generalmente encontrado en humanos, ya que *Candida* produce solamente D-arabinitol, mientras que los humanos producen sólo L-arabinitol, por lo que la proporción D-arabinitol / L-arabinitol es útil para diferenciar pacientes con CI de los que tienen fallo renal. La proporción D-arabinitol / L-arabinitol en orina puede ser un marcador temprano de las CI.

Además del Manano, el glucano es un componente importante de la pared celular que se libera durante la infección y puede detectarse (1→3)-b-D-glucano en el plasma. Aunque no es específico de las CI, puede utilizarse en el diagnóstico de varias micosis, incluidas las CI. El ser humano carece de glucanasas para digerir el (1→3)-b-D glucano y por tanto, la eliminación de este metabolito es lenta. La evaluación preliminar de la técnica ha mostrado una sensibilidad mayor que el 78% y una especificidad mayor del 87,5% en el diagnóstico de la candidemia. Odabasi et al han observado que el (1→3) -b-D-glucano se vuelve positivo en una media de diez días antes que el diagnóstico clínico. Se han detectado resultados falsos-positivos en pacientes en tratamiento con hemodiálisis con aparatos que tengan membranas de celulosa, así como aquellos tratados con albúmina o productos de globulinas, agentes anti-cancerosos (lentinan, crestin y sizofuran) y ciertos antibióticos.

Digby et al no han encontrado útil la detección de (1→3)-b- D-glucano para diferenciar la infección fúngica invasora de la infección bacteriana en pacientes críticos. Este estudio, aunque se realizó prospectivamente, solamente analizó una muestra de cada paciente, lo que puede haber

disminuido notablemente la sensibilidad de la prueba y algunos de los subgrupos de pacientes eran demasiado pequeños para obtener conclusiones significativas. La detección de (1→3)-b-D-glucano se ha utilizado también para seleccionar pacientes quirúrgicos con colonización por *Candida* que podrían beneficiarse de un tratamiento antifúngico empírico. (4)

5.5.1 Técnica de ELISA para la detección del antígeno Manano de *Candida spp.*

Es una técnica enzimática que permite la detección de antígenos en una muestra de paciente; los tipos de ELISA pueden ser directas e indirectas dependiendo de lo que se busque y el método. (5) (8-10).

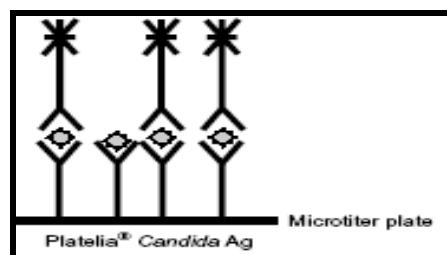


Figura 3. Esquema de acción de la prueba de ELISA para la detección del antígeno Manano de *Candida spp.* Platelia™ *Candida Ag*. BIO RAD.

En el caso de la técnica para detección del antígeno Manano se utilizó un tipo de ELISA denominado **Tipo Sándwich**. (Ver anexo 2).

5.6 PROTEÍNA C REACTIVA

La proteína C reactiva (PCR) no es detectable en el suero normal, pero aparece en numerosas situaciones de inflamación aguda y cuando existe necrosis tisular, la PCR aparece en el suero y empieza a elevarse antes

de que se aumente la velocidad de sedimentación globular VSG que es otro indicativo de infección e inflamación, a menudo entre las 24 a 48 horas siguientes al comienzo de la inflamación. Esta es asociada por medio de su elevación en el suero a infecciones tanto bacterianas como micóticas en pacientes con neoplasias, trastornos inmunológicos y pacientes con tratamientos para transplantes. (34) (39)

5.7 CRITERIOS EORTC/MSG (European Organization of the Research and Treatment of Cancer / Mycoses Study Group).

La EORTC es una organización europea integrada por médicos oncólogos voluntarios creada hace 40 años con el fin de buscar nuevas herramientas para el tratamiento del Cáncer; por medio de sus investigaciones han establecido una serie de parámetros que ayudan en el diagnóstico de patologías asociadas a Cáncer como las Infecciones Fúngicas Invasivas (IFI).

El estudio e investigación y la recopilación de datos para el diagnóstico y tratamiento contra las IFI creada por sus integrantes, establecieron criterios que son ahora utilizados por la gran mayoría de los médicos oncólogos en el mundo con el fin de tratar las patologías además de las de tipo infeccioso asociadas al Cáncer como Aspergilosis Criptococosis y Candidiasis entre otras.

La IFI son clasificadas como probadas, probables y posibles; en el caso de la CI las IFI probadas son aquellas en las que hay un hallazgo histopatológico, citopatológico, radiológico o en muestras estériles en la que se observen estructuras de forma levaduriformes además de pseudohifas e hifas, además de la recuperación del agente infeccioso en

medios de cultivo que permita la identificación del agente etiológico, junto a los criterios de riesgo que presente el paciente. (Ver anexo 1) (11).

Clasificación EORTC-MSG	Probada	Probable	Posible
<u>Criterios clínicos</u>			
■ Mayor: TAC ó Rx: infiltrados ó erosión extensión de las paredes sinusales evidentes de infección.	+ y	+ ó +	+ solo
■ Menor: tos, dolor de pecho disnea, congestión nasal, ulceraciones nasales, epistaxis, hinchazón peri orbital, lesiones necróticas o perforación del paladar.	+		
<u>Criterios microbiológicos</u>			
■ urocultivo positivos para <i>Candida</i>	+ y	+ ó	+ solo
■ Hemocultivo positivo para <i>Candida</i>	+	+	
<u>Criterios de alto riesgo</u>			
■ Neutropenia < de 500 cel/mm³	+ y	+	+ solo
■ Fiebre >38°C 96h	+	+	
■ Inmunosupresores > 30 días	+	+ ó	
■ Corticosteroides > 3 semanas	+	+	
■ Antibióticos de amplio espectro	+	+	

Tabla. 3 Criterios de selección en los pacientes con riesgo de IFI tipo Candidiasis. S. Ascioglu, J. H. Rex, B. De Pauw. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. 2002. Clinical Infectious Diseases; 34:7–14. (EORTC)

6. METODOLOGÍA

6.1 TABULACIÓN

Los datos que fueron recogidos durante el periodo de estudio se registraron teniendo en cuenta cada una de las variables que se requería en un formato diseñado especialmente para el estudio. Después de tener la base de datos completa, se procedió a grabarla en un formato Access del cual fue tomado para su posterior análisis estadístico.

6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio de todos los datos se utilizaron herramientas de estadística descriptiva.

6.3 DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LABORATORIO

6.3.1 Detección del antígeno Manano

La detección de Manano de *Candida* Platelia ® es una técnica inmunoenzimática en un tiempo, de tipo sandwich en microplaca, que permite la detección cuantitativa y semicuantitativa del antígeno circulante en suero humano.

6.3.2 Detección de la PCR

La detección de PCR, Products VITROS Chemistry ® es una técnica inmunoenzimática tipo sándwich realizada mediante el método de química seca.

6.4 PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

6.4.1 Captación de Pacientes

Los pacientes que ingresaron al estudio fueron seleccionados de manera estricta de manera que corrieran el riesgo de Infección Fúngica Invasiva utilizando como herramienta para esta selección los criterios de la EORTC/MSG.

Los pacientes posteriormente seleccionados se le ordenaron: cuadro hemático, PCR y signos vitales para establecer el estado de ingreso de cada uno y además para analizar el estado inmunológico e infeccioso inicial.

Tendiendo en cuenta el estado inicial y el esquema quimioterapéutico dado por el hematólogo se observaba el desarrollo del paciente analizando el conteo de leucocitos y su respectivo diferencial para analizar si presentó o no neutropenia lo cual definía si a el paciente se le ordenaba estudios especiales como título antigénico de Manano para *Candida spp* además de cultivos microbiológicos y en algunos pacientes estudios imagenológicos que permitieran observar una agente infeccioso establecido en el paciente.

7. RESULTADOS

7.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS

Durante el periodo de estudio se incluyeron un total de 103 pacientes a los cuales se les aplicó los criterios de selección, estableciendo una población óptima de 35 pacientes. En estos pacientes se hizo un análisis de las variables propuestas por el estudio de acuerdo a la bibliografía.

Según el análisis estadístico la edad promedio fue de 38 años con un rango de 17 a 73 y una DS de 16,6; donde el genero de los pacientes no presento mayor diferencia y su procedencia en su mayoría fue Bogotá (65.7%). (Tabla 4)

<i>Variable</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>
Edad		
< de 20 años	3	8.57%
21 – 40 años	17	48.57%
> de 41 años	15	42.85%
Sexo		
Femenino	18	51.42%
Masculino	17	48.57%
Procedencia		
Bogotá	23	65.71%
Otros	12	34.28%

Tabla 4. Variables demográficas de los pacientes del estudio.

7.2 VARIABLES CLÍNICAS

7.2.1 Estado de enfermedad del paciente

La patología predominante fue la Leucemias Linfoide Aguda; También gran parte de los pacientes se encontraban en fase de inducción, donde la mayoría eran tratados con esquemas quimioterapéuticos en los cuales estaban incluidos: Hyper-CVAD (Ciclofosfamida, Vincristina, Doxorubicina y Dexametasona), CODOX-M (Ciclofosfamida, Vincristina, Doxorubicina - Metotrexate y RCFM (Rituxan, Ciclofosfamida, Fludarabina y Mitoxantrona) . (Tabla 5)

Variable	Frecuencia	Porcentaje
Patología		
Leucemia Linfoide Aguda	14	40.0%
Leucemia Mieloide Aguda	7	20.0%
Linfoma No Hodgkin	5	14.2%
Linfoma Hodgkin	2	5.7%
Otras	7	20.0%
Fase del tratamiento quimioterapéutico		
Inducción	5	42.86%
Rescate	10	28.57%
Consolidación	6	17.14%
Paliativo	4	11.43%
Quimioterapia		
HyperCVAD	13	37.14%
CODOX-M	3	8.57 %
RCFM	2	5.71%
Otros	17	48.58%

Tabla 5. Variables clínicas de los pacientes del estudio

También se consideró si los pacientes en estudio estaban sometidos como tratamiento al Transplante Autólogo de Medula Ósea (TAMO),

presentándose solo un caso.

7.2.2 Uso de Antibióticos y antifúngicos.

El análisis de esta variable arrojó como resultado el uso de Antibióticoterapia en 33 pacientes, los antibióticos más usados fueron: Vancomicina + Cefepime y Vancomicina + Cefepime + Meropenem. Dentro del esquema antifúngico utilizado como protocolo al día 8 del estado de neutropenia en los pacientes con riesgo de IFI se encontró que 10 pacientes se encontraban en tratamiento, los antifúngicos más utilizados fueron; Anfotericina B, Voriconazol y Fluconazol. (Tabla 6)

Variable	Frecuencia	Porcentaje (%)
Antibióticoterapia	33	94.2
Vancomicina + Cefepime	14	42.4
Vancomicina + Cefepime + Meropenem	9	27.7
Otros *	10	30.3
Sin Antibióticoterapia	2	5.7
Terapia antifúngica	10	28.7
Anfotericina B	7	70
Fluconazol	1	10
Anfotericina B + Fluconazol	1	10
Voriconazol	1	10
Sin terapia antifúngica	25	71.3

Tabla 6. Uso de Antibióticos y Antifúngicos en los pacientes del estudio.

7.2.3 Análisis de otras variables clínicas: Cirugía, Catéter, Hiperalimentación y Corticoides.

Estas variables no presentaron una asociación causal estadísticamente significativa con relación a la supervivencia de los pacientes incluidos en el estudio. (Tabla 7)

Variable	Frecuencia	Porcentaje
Uso de Catéter Intravenoso (CIV)	3	8.57%
Uso de Corticoides	10	35.0%
Uso de CIV + Corticoides	10	35.0%
Alimentación Parenteral	1	2.85%
Cirugía abdominal durante la estancia hospitalaria.	0	0%

Tabla 7. Asociación causal entre las variables: cirugía, catéter, Hiperalimentación, corticoterapia y supervivencia de los pacientes del estudio al día 30. * OR de tendencia NO significativo.

7.3 VARIABLES DIAGNÓSTICAS

7.3.1 Cultivos microbiológicos y agentes etiológicos aislados.

Durante el periodo de estudio, se aisló *Candida albicans* de un urocultivo, muestra no estéril, en la mayoría de los casos solo se recuperó agentes etiológicos bacterianos o micóticos diferentes a *Candida* (48.57%).

(Tabla 8)

Variable	Frecuencia	Porcentaje
Cultivos microbiológicos		
Hemocultivo + urocultivo	16	45.7%
Hemocultivo	9	25.7%
Urocultivo	5	14.2%
Otros *	4	8.57%

Microorganismos aislados		
<i>Candida spp</i>	1	2.86%
<i>Aspergillus spp</i>	2	5.71%
Gérmenes comunes °	15	42.85%
Sin aislamiento	17	48.57%

Tabla 8. Agentes etiológicos aislados, cultivos microbiológicos y su frecuencia en los pacientes del estudio.

* Líquido pleural, punta de catéter. ° *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S pneumoniae*

7.3.2 Proteína C reactiva.

La PCR que se tomó en este estudio como valor diagnóstico fue \geq a 9 mg/dl; 29 pacientes presentaron un aumento de la PCR por encima de 9 mg/dl (83%) y 17% un valor $<$ a 9 mg/dl (n =6) como se puede observar en el gráfico 1.

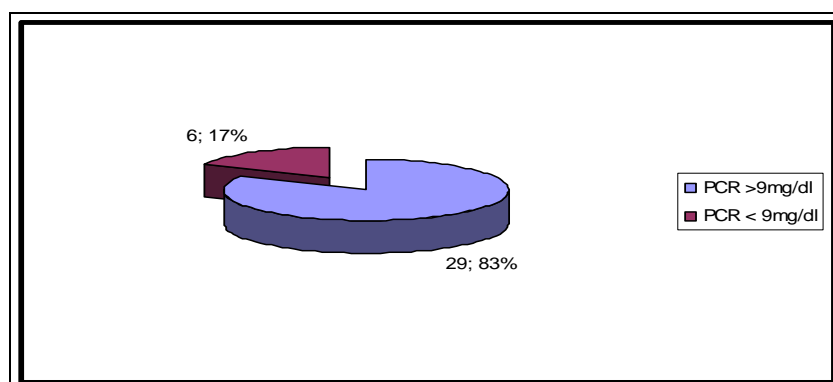


Gráfico 1. Datos de la PCR en los pacientes del estudio.

7.3.3. Prueba antigénica de Manano para *Candida spp*.

Aunque la positividad en la prueba antigénica tuvo relación con la disminución del estado de supervivencia de los pacientes, no se presentó una asociación estadísticamente significativa entre los títulos de Manano y

la supervivencia de los pacientes. (Tabla 9) (Figura 4)

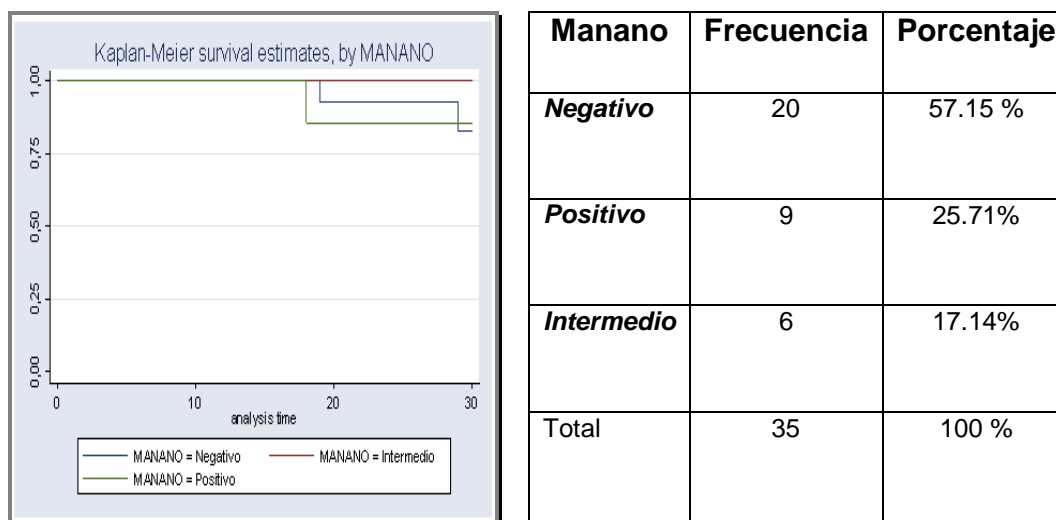


Tabla 9. Determinación de títulos antigénicos de Manano y su frecuencia en los pacientes del estudio.

Figura 4. Función de supervivencia según los resultados de títulos antigénicos de Manano.

7.3.3.1 Asociación entre los títulos serológicos del antígeno Manano de *Candida spp* y la PCR.

Este estudio mostró que el 7 de los 9 pacientes con niveles de PCR mayor a 9 mg/dl presentaron a su vez títulos antigénicos de manano mayores a 0.50 ng/ml (Tabla 1) considerados positivos. (Tabla 10)

Manano	PCR < 9 mg/dl	PCR > 9 mg/dl	Total
Intermedio	2	4	6
Negativo	3	17	20
Positivo	2	7	9
Total	7	28	35

Tabla 10. Asociación entre títulos del Antígeno Manano y PCR en los pacientes del estudio.

*OR de tendencia NO significativo $\chi^2= 1.006$ $P=0.604$

7.3.3.2 Asociación títulos antigénicos de Manano, el cultivo microbiológico, la histopatología y las Imágenes Diagnósticas.

Al hacer el estudio de las imágenes diagnósticas para la búsqueda de IFI asociada a *Candida spp*, en este caso se observó que en 19 de los pacientes (54.28%) presentaron imágenes normales y solo en 16 pacientes (45.71%) presentaron anormalidades concluyentes con un diagnóstico de IFI en las imágenes diagnósticas. De aquellos pacientes a quienes se les reporto algún tipo de anormalidad imagenológica, 3 pacientes presentaron los títulos positivos para el antígeno manano y en 2 pacientes estos títulos antigénicos fueron intermedios.

7.4 SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO.

7.4.1 Supervivencia de los pacientes durante la estancia hospitalaria.

De los 35 pacientes incluidos en el estudio 91.43% (n= 32) estaban vivos y el 8.57% (n= 3) murieron al día 30 del periodo en estudio, como se puede observar en la tabla 9 en la que se expresa la relación del tiempo en la estadía hospitalaria como rango en días.(Tabla 11)

Tiempo hospitalización	n	Porcentaje (%)	(Fallecidos)
<20 días	13	37.14	2
21-40 días	17	48.57	3
41-60 días	4	11.42	1
>60 días	1	2.85	0

Tabla 11. Supervivencia de los pacientes durante la estancia hospitalaria.

7.4.2 Función de supervivencia de Kaplan – Meier

En relación a la supervivencia de los pacientes neutropenicos febriles, al día 30, con mayor riesgo de presentar una infección micótica invasiva, se observó una tasa de 3.8 muertes por cada 1000 días/paciente, con un total de 787 días en riesgo. (Figura 5).

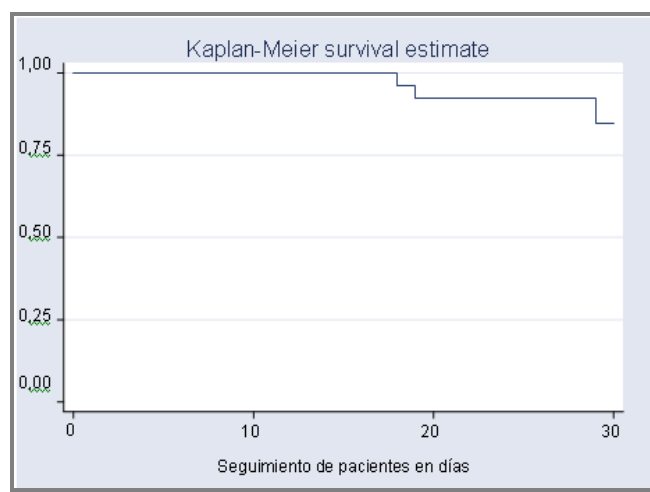


Figura 5. Función de supervivencia de los pacientes contra el tiempo en riesgo.

7.5 DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN FÚNGICA INVASIVA (IFI) PROBADA, PROBABLE O POSIBLE SEGÚN LOS CRITERIOS DE LA EORTC/MSG.

Para el análisis de esta variable se tuvieron en cuenta cada uno de los parámetros dados por la EORTC/MSG (11) (ver anexo 1) para establecer el diagnóstico probado, probable o posible para las IFI, se tuvieron en cuenta: la patología de base, el agente etiológico (si se había aislado), el aislamiento de algún tipo de *Candida spp* en medios de cultivo y la imagen diagnóstica, si la tenía. (Grafico 2)

Realizando una correlación entre los títulos antigénicos de manano y los criterios de la EORTC-MSG, se observó que los pacientes con títulos positivos para manano de *Candida* (n=9), 55.5% (n=5) se clasificaron como IFI Probables, presentando todos un valor de PCR mayor a 9 mg/dl. (Tabla 10). Se presentó el caso de un paciente al cual se le aisló *Candida albicans* de un urocultivo, la muestra se considera como no estéril lo que la descarta de una IFI probada y lo clasifica como una IFI probable; el título antigénico fue menor de 0.25 ng/ml.

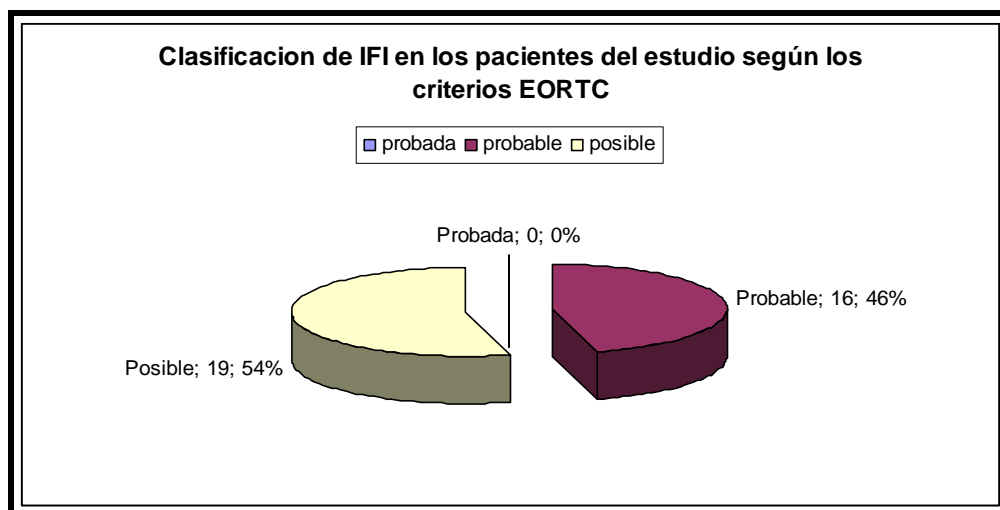


Gráfico 2. Porcentaje de criterios diagnósticos según la EORTC en los pacientes del estudio.

Del total de los pacientes clasificados con IFI probable el 25% tuvieron títulos de manano positivos y el 87% con valores de PCR mayores a 9 mg/dl; de las clasificaciones posibles según los criterios de la EORTC, el 26% presentaron títulos antigénicos positivos para manano, de los cuales el 80% presentaron títulos de PCR mayor a 9 mg/dl.

Edad	Patología de base	Cultivo microbiológico	Aislamiento A.E de tipo	Imágenes diagnósticas	Clasificación EORTC	PCR > 9 mg/dl
------	-------------------	------------------------	-------------------------	-----------------------	---------------------	---------------

			fúngico			
40	LLA	SI	Si <i>Aspergillus spp</i>	Normal	Probable	Si
42	A M	NO	No	Anormal	Probable	Si
57	LLA	SI	No	Normal	Posible	No
73	LMA	NO	No	Anormal	Probable	Si
50	LNH-B	SI	No	Normal	Probable	Si
20	L C P	SI	No	Anormal	Probable	Si
25	L M A	SI	No	Normal	Posible	Si
27	LLA	SI	No	Normal	Posible	Si
23	LMA	SI	No	Normal	Posible	No

Tabla 12. Variables de los pacientes del estudio con títulos antígenicos de manano de *Candida* positivos.

LLA Leucemia Linfocítica Aguda
LMA Leucemia Mielocítica Aguda
AM Aplasia Medular
LNH-B Linfoma No Hodgkin Burkitt
LCP Leucemia de Células Peludas
A.E Agente Etiológico

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El título serológico del antígeno manano de *Candida spp*, puede ayudar en el diagnóstico de las CI en los pacientes con neoplasias hematolinfoides, esta, además de ser una prueba rápida y específica que antecede a los cultivos microbiológicos y con el uso combinado de técnicas serológicas como la detección de anticuerpos anti-manano en muestras seriadas de pacientes, aumentan la sensibilidad en el diagnóstico de infección fúngica. (1, 4)

Como lo sugiere el grupo de investigación de la EORTC-MSG el promedio de edades de los pacientes que pueden presentar un riesgo de IFI se encuentran dentro de los estadios extremos de la vida, en nuestro estudio la mayoría de los pacientes se encontraban entre 20 y 40 años, seguidos de los pacientes mayores de 41 años; un promedio casi igual tanto de hombres como mujeres, lo cual indica que el riesgo de IFI está dado para ambos géneros teniendo en cuenta la patología de base; la mayoría de los pacientes fueron de Bogotá, esto es de vital importancia ya que en sitios diferentes a las grandes capitales es muy difícil hacer un diagnóstico rápido y oportuno de las IFI, lo cual podría ser un factor determinante para el desencadenamiento de la patología oncológica de base en la cual se encuentra el paciente disminuyendo drásticamente su calidad de vida.(2, 7, 11)

El estadio de neutropenia febril es un factor importante para el desarrollo de las micosis en especial las oportunistas e invasivas, como lo indica Jean-Marcel Senet (3), ya que la falla del sistema inmune causada por el uso de agentes quimioterapéuticos como el Hyper-CVAD (Ciclofosfamida, Vincristina, Doxorubicina y Dexametasona), CODOX-M (Ciclofosfamida, Vincristina, Doxorubicina - Metotrexate y RCFM (Rituxan, Ciclofosfamida, Fludarabina y Mitoxantrona), enfermedades del sistema inmune como inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes y patologías oncológicas de

tipo linfoide, que disminuyen de la población mieloide (en especial los fagocitos, importantes células del sistema de defensa de primer orden) haciendo al sistema inmune incapaz de responder contra los hongos además de otros microorganismos, desarrollándose con mayor facilidad la infección fúngica volviéndose invasiva. (1,3, 6, 8, 11, 17)

Dentro del estudio se observó que la mayoría de los pacientes padecían de enfermedades oncológicas hematolinfoides como Leucemias y Linfomas, estas se han establecido como un factor de riesgo para la colonización de agentes etiológicos como lo indica la EORTC-MSG, causantes de IFI dentro de los cuales tenemos especies como: *Candida spp*, *Aspergillus spp* y *Cryptococcus spp*; estas enfermedades hemato-oncológicas sumadas al uso de catéteres, alimentación parenteral, cirugía abdominal y corticoides, hacen que se presenten con mayor facilidad patologías como las Candidiasis Invasivas, Aspergilosis y Criptococosis entre otras, en lugares como las unidades de cuidados intensivos (UCI), aumentando la morbilidad y la mortalidad de los pacientes en tratamiento, esto también aplica para los pacientes que se encuentran en el proceso de Transplante Autólogo de Medula Ósea, ya que estos requieren de un tratamiento inmunosupresor aunque esta variable solo se presentó en un solo paciente de los que estuvieron durante el estudio.(1, 3, 6, 11)

La recuperación del agente etiológico es necesaria para poder identificar el origen de las CI y otras enfermedades fúngicas, además, el uso de pruebas como la detección del antígeno Manano de *Candida spp*, junto a otras como los títulos de anticuerpos anti-manano, los cultivos microbiológicos y las imágenes (Rx y TAC), pueden ayudar a diagnosticar infecciones micóticas antes de que estas se vuelvan sistémicas; esto permite encontrar el agente etiológico específico de causante de las CI, dar un tratamiento específico, disminuir la estancia hospitalaria y mejorar la calidad de vida del pacientes

además de servir como un economizador de recursos en la entidad donde el paciente es tratado. (1-19).

Uno de los mayores problemas en el diagnóstico de las IFI son los aislamientos de los agentes etiológicos con los cuales se prueba la existencia de un organismo colonizador causante de una enfermedad fúngica, ya que, aunque actualmente los cultivos microbiológicos se utilizan como recurso para el aislamiento, su nivel de recuperación no es excelente (menos del 60%) y el tiempo requerido para su aislamiento es poco útil para hacer un diagnóstico rápido. En nuestro estudio se observó que la mayoría de los cultivos realizados no presentaban microorganismos aislados; el agente etiológico *C. albicans* que se aisló no clasificó al paciente como una IFI PROBADA de acuerdo a los criterios de la EORTC-MSG, ya que la muestra cultivada no provenía de un sitio estéril, siendo esto indispensable debido a que varias especies de *Candida* dentro de estas *C. albicans* son parte de la flora normal del organismo y además están presentes en el medio ambiente. (1, 2, 6, 11, 12, 13, 16)

En nuestro estudio aunque no se presentó una asociación estadísticamente significativa entre los títulos de manano y la PCR en los pacientes, se observó que en la mayoría de los casos probables y posibles la PCR eran mayor a 9 mg/dl, lo que muestra que puede haber una asociación entre los resultados de la PCR y los títulos antigénicos, que combinados podrían ayudar a diagnosticar una CI.

Además, se analizaron los títulos antigénicos positivos con respecto a las siguientes variables: en 55.5% pacientes hubo uso de corticoides (3), 100% de los pacientes presentaron alimentación parenteral (3); 77.7 % tenían catéter (36), 88.8% presentaron PCR mayor a 9 mg/dl, y 100% tenían neutropenia; todos los anteriores son factores de riesgo asociados a CI. (3)

De acuerdo al criterio EORTC/MSG el título antigénico positivo de manano para *Candida* es indicativo de una infección fúngica posible y en el caso de nuestro estudio se presentaron 16 probabilidades, como se describió anteriormente la gran mayoría de los pacientes presentaron también variables críticas para poder diagnosticar una CI. En los pacientes a quienes los resultados antigénicos de manano para *Candida* dieron positivos no hubo una recuperación del agente etiológico que puede deberse a que la recuperación del agente etiológico es muy baja (< del 60%). (1-32)

9. CONCLUSIONES

Los títulos antigénicos de manano para *Candida spp*, la PCR, en conjunto con las imágenes como las radiografías y las tomografías axiales computarizadas, los cultivos microbiológicos y la patología de base del paciente, en conjunto pueden esclarecer el diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas.

Los pacientes que tuvieron el riesgo de presentar una IFI eran en su mayoría pacientes con patologías onco-hematológicas de tipo Leucemia y Linfoma, estas variables son muy importantes ya que el paciente se encuentra con un mayor riesgo de infección debido a la falla del sistema inmune por la patología de base, además de generarse una inmunodeficiencia por el uso de agentes quimioterapéuticos como el Hyper CVAD.

Se observó que puede haber una relación entre los títulos antigénicos de manano de *Candida* y la mortalidad de los pacientes y aunque esta no haya sido estadísticamente significativa es un factor que debe ser prescindible analizar en el estudio de patologías relacionadas en pacientes con malignidades hemato-oncológicas.

Aunque la PCR no presentó una mayor asociación con los títulos antigénicos de manano de *Candida* en los pacientes a los cuales se les hizo seguimiento, este puede ser un marcador de la respuesta del paciente frente al agente infeccioso, puede ayudar a evaluar la respuesta inmune y el desencadenamiento de la IFI por medio de su medición seriada y acompañada de otras pruebas diagnósticas.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir con el estudio realizando una serie de recolección de datos de manera que se tengan muestras seriadas bisemanales de los pacientes para poder analizar el estado antigénico y la respuesta del paciente con el tratamiento antifúngico utilizado, lo que permitirá también evaluar la efectividad de este.

Para que todas las variables puedan ser estudiadas de manera que se obtengan datos con niveles de confianza óptimos se sugiere que se aumente el número de pacientes teniendo en cuenta las variables de este estudio ya que permiten limitar muchos sesgos que se puedan presentar y así poder hallar una relación significativa entre las variables propuestas y el desarrollo del paciente en su estado vital.

Para poder realizar un diagnostico mas efectivo de las CI se recomienda el uso de la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos contra el antígeno Manano ya que permite elevar el nivel de sensibilidad y especificidad a mas del 90%.

11. REFERENCIAS

1. Maura Prellaa, et all. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diag Microb and infectious disease*. 51 (2005) 95-101.
2. Jose Pontón. Diagnostico microbiologico de las micosis. *Rev Iberoam Micol*. 2002; 19: 25-29.
3. Jean-Marcel Senet. Risk factors and physiopathology of Candidiasis. Review. *Rev Iberoam Micol*. 1997; 14: 6-13.
4. Jose Pontón. Microbiological non-culture methods for the diagnosis of invasive candidiasis: usefulness of surrogate markers. *Rev Iberoam Micol*. 2006; 23: 20-25.
5. Boualem sendid et all. Contribution of the *Platelia candida*. Specific antibody and antigen test to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *J Clin Microbiology*. Oct 2003, p. 4551-1558.
6. Guillermo Quindós. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2002; 19: 1-4.
7. Ming-Fang Cheng et all. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species. *BMC Infectious Diseases*. 07 April 2005. Page 1-5.
8. Boualamed Sendid et all. Combined detection of mannanemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of

systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. J.Med.Microbiology. vol 51 (2002) 433-442.

9. Platelia™ *Candida* Ag. Detección del antígeno Manano de *Candida* en suero por el método inmunoenzimático. BIO RAD.
10. Platelia™ *Candida* Ac. Detección de anticuerpos anti Manano de *Candida* en suero por el método inmunoenzimático. BIO RAD.
11. S. Ascioglu, J. H. Rex, B. De Pauw. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. 2002. Clinical Infectious Diseases; 34:7–14. (EORTC).
12. Boualamed Sendid et all. New enzyme immunoassay for sensitive detection of circulating *Candida albicans* Mannan and Antinannan antibodies: Useful combined test for diagnosis of Systemic Candidiasis. Journal of Clinical Microbiology; may 1999, p. 1510-1517.
13. Tomas P. Monson et all. Mannose in body fluids as an indicator of Invasive Candidiasis. Journal of Clinical Microbiology, Nov. 1981, p.557-562.
14. Louis de Repentigny et all. Comparison of serum mannan, arabinol, and mannose in experimental disseminated Candidiasis. Journal of Clinical Microbiology, June 1984, p. 804-812.
15. Frans M. Verduyn Lunel, et all. Detection of the *Candida* antigen Mannan in cerebrospinal fluid specimens from patients suspected

of having Candida meningitis. Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2004, p. 867-870.

16. Akira Nakamura, et al. Diagnosis of Invasive Candidiasis by detection of mannan antigen by using the Avidin-Biotin enzyme immunoassay. Journal of Clinical Microbiology, Nov. 1991, p 2363-2367.
17. Guillermo Quindos et al. Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis? Rev Iberoam Micol 2004; 21: 10-14.
18. Thomas Nichterlein et al. Comparison of glucan detection and galactomannan immunoassay in gastrointestinal and systemic murine candidiasis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 46 (2003) 103-108.
19. Erna M. Kojic and Rabin O. Darouiche. Candida infections of medical devices. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2004, p 255-267.
20. M.G. Shepherd, R.T.M Poulter, and P.A Sullivan. Candida albicans: biology, genetics and pathogenicity. Ann. Rev. Microbiol. 1985. 39: 579-614.
21. James Mosuoka. Surface glycans of Candida albicans and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses and experimental challenges. Clinical Microbiology Review, Apr. 2004, p. 281-310.
22. Tomas J. Walsh and Philip A. Pizzo. Nosocomial fungal infections: a classification for acquired fungal infections and mycoses arising

from endogenous flora or reactivation. *Ann. Rev. Microbiol*, 1988. 42: 517-545.

23. Jose P. Martinez et al. Serologic response to cell wall mannanoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 1998, p 121-141.

24. Jo- Anne H. van Buril and Paul T. Magee. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Ann. Rev. Microbiol*. 2001. 55: 743-772.

25. Johnsie W. Barley et al. Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, May 1985, p. 749-752.

26. Louis de Repentigny et al. Comparison of Enzyme Immunoassay and Gas-Liquid Chromatography for the Rapid Diagnosis of Invasive Candidiasis in Cancer Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, June 1985, p. 972-979.

27. Marie-Elisabeth Bougnoux et al. Comparison of antibody, antigen and metabolite assays for hospitalized patient with disseminated or peripheral candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, May 1990, p. 905-909.

28. G-J Platenkamp et al. Diagnosis of invasive candidiasis in patients with and without signs of immune deficiency: a comparison of six detection methods in human serum. *J Clin Pathol*, 1987, 40: 1162-1167.

29. P. Lewis White et al. Comparison of Non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with and emphasis on invasive candida infections. Journal of Clinical Microbiology, May 2005, p. 2181-2187.
30. Jan Kosonen et al. Increased levels of candida albicans mannan specific T cells derived antigen binding molecules in patients with invasive candidiasis. Clinical and vaccine immunology, Apr. 2006, p. 467-474.
31. Jeffrey M Jones. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Clinical Microbiology Reviews, Jan 1990, p. 32-45.
32. Parslow Tristram G. Inmunológica básica y clínica. 10ª Edición. Manual moderno 2002.
33. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. Editorial Manual Moderno 2005.
34. Brook. Biología de los microorganismos. Octava edición. Editorial Prentice Hall. 2000.
35. Mosby. Diccionario de medicina. Edición .Editorial OCEANO. 2005
36. Gary W. Procop, MD^a, Glenn D. Roberts, PhD. Emerging fungal diseases: the importance of the host. Clinics in Laboratory Medicine 24 (2005) 691-719.
37. Peter G Pappas MD. Invasive Candidiasis. Infectious Diseases Clinics of America. 20 (2006) 485-506.

38. Nina Singh. Jhon R Perfect. Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses. *Lancet Infect Dis.* 7 (2007) 395-401
39. Massimo Offidani. Laura Corvalta. Lara Malerba. Diagnostic value of C-reactive protein in discriminating fungal from nonfungal pulmonary infiltrates in patients with hematologic malignancies. *Support Care Cancer* (2006) 14: 874-877.
40. Luigina Romani. *Nature Reviews. Immunology* (Enero 2004). Volumen 4: 1-13.

ANEXOS

ANEXO. 1 CRITERIOS EORTC

Tabla 1. Definiciones para las infecciones fúngicas invasivas en pacientes con cáncer y receptores de trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas. (4).

Categoría, tipo de infección	Descripción
Infección fúngica invasiva Probada Daño de tejido infectado Miceliales ¹ m	Examen histopatológico o citopatológico de muestras como lavado broncoalveolar, biopsias, evidenciando hifas o tejido dañado, cultivo positivo obtenido de muestras estériles, signos clínicos o radiológicos anormales consistentes con la infección.
Levaduriformes ¹	Examen histopatológico o citopatológico de muestras como aspirados, biopsias, excluyendo membranas mucoides, evidenciando células levaduriformes (especies de <i>Candida</i> la mayoría mostrando pseudohifas o hifas verdaderas) cultivo positivo obtenido de muestras estériles, signos clínicos o radiológicos anormales consistentes con la infección.
Fungemia Miceliales ¹	Hemocultivo positivo, acompañado de signos y síntomas clínicos compatibles con la revelación del microorganismo.
Levaduriformes ¹	Hemocultivo positivo para <i>Candida</i> u otras levaduras, acompañado de signos y síntomas clínicos compatibles con la revelación del microorganismo.
Infección fúngica endémica ²	Cultivo probado del sitio afectado con síntomas atribuidos a la infección fúngica, cultivo con resultado negativo, en examen histopatológico evidencia microscópica de hongos dimórficos (<i>Blastomyces</i> , <i>Coccidioides</i> y especies de <i>Paracoccidioides</i>)
Diseminado	Hemocultivo positivo o detección antigénica positiva.
Infección fúngica invasiva probable	Por lo menos 1 criterio de alto riesgo (Tabla 2); 1 criterio microbiológico y 1 criterio clínico mayor (o menor) anormal, consistente con la infección.

Infección fúngica posible	Por lo menos 1 criterio de alto riesgo; 1 criterio Microbiológico ó 1 criterio clínico mayor o Menor anormal, consistente con la infección.
---------------------------	---

¹. Identificación del género y especie por medio del cultivo.

². Histoplasmosis, blastomycosis, coccidioidomycosis, y paracoccidioidomycosis.

Tabla 2. Criterios de alto riesgo, microbiológicos y clínicos para infecciones fúngicas invasivas en pacientes con trastornos hematológicos y trasplante de medula ósea. (4)

Tipo de criterio	Criterio
Alto Riesgo	Neutropenia (<500 neutrófilos/mm ³ por 10 días) Fiebre persistente >96 h en pacientes con alto riesgo y que están siendo tratados con antibiótico de amplio espectro. Temperatura corporal >38 ⁰ C ó <36 ⁰ C, con factores predisponentes; neutropenia prolongada mayor de 10 días, administración de agentes inmunosupresores en 30 días previos, es un índice de infección fúngica invasiva probable o posible en un episodio de neutropenia, o coexistente con SIDA. Prolongado uso de corticoesteroides (>3 SEM) en los anteriores 60 días.
Microbiológicos	Cultivos positivos para hongos miceliales (aislando gérmenes como <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> o algunas especies de Zygomycetos) o de muestras como esputo, lavado broncoalveolar. Evidencia microscópica de morfología compatible con hongos miceliales, obtenida del germen aislado en el cultivo. Evidencia microscópica de morfología compatible con especies de <i>Cryptococcus</i> en muestras como esputo o lavado broncoalveolar. títulos antigénicos positivos para <i>Aspergillus</i> en lavado broncoalveolar, LCR o 2 muestras serológicas seriadas positivas. títulos antigénicos positivos para <i>Cryptococcus</i> en sangre. Evidencia microscópica directa para elementos Fúngicos en muestras estériles. títulos antigénicos positivos para <i>Histoplasma Capsulatum</i> , en suero, orina o LCR. Dos urocultivos positivos para <i>Candida</i> . Hemocultivos positivos para especies de <i>Candida</i> .
Clínicos	
Infección del tracto respiratorio bajo Mayor	Nuevos infiltrados observados en la Tomografía Axial Computarizada.

Menor	Síntomas indicativos de infección en el tracto respiratorio bajo, (tos, dolor en el pecho, disnea)
Sino nasal infección Mayor	Evidencia sugestiva radiológica de infección fúngica invasiva en sinuses (erosión o extensión en las paredes sinusales evidente de infección)
Menor	Síntomas respiratorios (congestión nasal), ulceraciones nasales, epistaxis, hinchazón periorbital, lesiones necróticas o perforación en el paladar.
Infección del Sistema Nervioso Central Mayor	Evidencia radiológica sugestiva de una infección en el SNC (mastoiditis u otros focos infecciones, enfisema extradural).
Menor	Signos y sintomatología menor de foco Neurológico, cambio mental, irritación Meníngea, anormalidades en la bioquímica y celularidad del LCR (con cultivo negativo en LCR y negativo para malignidades).
Diseminación de la infección fúngica	Diseminación papular o nodular, provocando Lesiones.
Diseminación crónica de candidiasis	Abscesos pequeños, periféricos, en hígado y/o Bazo demostrado por un TAC, ultrasonido, elevación sérica de los niveles de fosfatasa alcalina. También soportado por un criterio microbiológico.

ANEXO 2. INFORMACIÓN KITS DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO MANANO DE *Candida spp* BIORAD

Información sobre los kits antígeno

Platelia *Candida* Ag

(Bio-Rad)

Es un ELISA que detecta Manano en suero utilizando el anticuerpo monoclonal EBCA1. Este anticuerpo reconoce residuos β -1,5 del Manano de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. pseudotropicalis* pero no de *C. krusei*. El límite de detección de la prueba es 0,25 ng/ml de suero. Para aumentar su rendimiento, el fabricante aconseja utilizarla conjuntamente con la técnica de detección de anticuerpos Platelia *Candida* Ac/Ak/Ab.

- **Reactivos y material**

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Pipetas de 50, 100, 300 y 1.000 μ l.
- Tubos Eppendorf o similares de 1,5 ml con tapones herméticos que resistan el calentamiento a 100 °C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 ml que permita la centrifugación a 10.000 g.
- Agitador para tubos.
- Baño para hervir las muestras.
- Baño o estufa para incubar las muestras a 37 °C.
- Lavador de microplacas.
- Lector de microplacas equipado con filtros de 450 y 620 nm.

- **Almacenamiento y transporte de las muestras de suero**

1. Procesamiento en menos de 24 h: refrigerar a 2-8 °C.
2. Procesamiento después de 24 h: congelar a -80 °C. No congelar y descongelar innecesariamente.

Procesamiento del suero

1. Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.
2. Se introducen 300 µl del suero a estudiar en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
3. Se añaden 100 µl de la solución de tratamiento proporcionada con la prueba. Cerrar el tubo con tapón hermético.
4. En un baño con agua hirviendo sumergir el fondo del tubo durante 3 min para liberar el Manano de los complejos con los anticuerpos.
5. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min. Retirar el sobrenadante para la detección de Manano.

ANEXO 3 MEDIOS DE CULTIVO COMPONENTES Y PREPARACIÓN.

AGAR SABOREAUD

Medio de cultivo semisintético; se utiliza de manera universal para la identificación sistémica de los diferentes agentes fúngicos.

- FÓRMULA:

Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Agar agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

- PREPARACIÓN:

Disolver el medio de cultivo con agua destilada (por cada 1000 mL de agua destilada se agregan 35 g de medio de cultivo), en un Erlenmeyer. Posteriormente se coloca en la autoclave a 121 °C durante 15 a 20 minutos, luego debe servirse en cajas de Petri.

AGAR PAPA DEXTROSA

Útil para el cultivo. Aislamiento y determinación del número de gérmenes de levaduras y mohos, a partir de alimentos y otros materiales.

- FORMULA

Infusión de papa	200g
D (+) – glucosa	20g
Agar-agar	15g
Agua destilada	1000 mL.

- PREPARACION

Disolver en 1 litro de agua destilada 39g del medio en un erlenmeyer, esterilizar y en autoclave por 15 a 20 minutos a 121°C. Después de esterilizado en medio verter en cajas de petri.

ANEXO 4 FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO.

Valor diagnóstico del título serológico del Manano de *candida* y la Proteína C-Reactiva en pacientes con neoplasias hematolinfoides y neutropenia con factor de riesgo de Candidiasis Invasivas. Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá, Colombia 2007.

Datos del paciente

Nombre del paciente: _____ Historia Clínica: _____

Lugar de procedencia: _____

Edad paciente: _____ años. Género: Masculino ☐ Femenino ☐

Fecha Ingreso paciente: _____ Fecha Egreso paciente: _____

Recolector de Información: _____

Servicio:

Piso 3 _____ Piso 5 _____ 5 TAMO _____

Estancia Hospitalaria _____ días

Condiciones del egreso

Vivo ☐

Muerto ☐

1. Patologías de base

Leucemia Mieloide Aguda	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>
Leucemia Linfoide Aguda	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>
Linfoma de Burkitt	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>
Linfoma Hodgkin	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>
Linfoma no Hodgkin	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>
Transplante de medula ósea	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>
Mieloma Múltiple	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>
Mielodisplasia	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>

2. Otras Patologías

HIV	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>
Diabetes	presente <input type="checkbox"/>	ausente <input type="checkbox"/>
Otra _____		

3. Quimioterapia

Si ☐

No ☐

Tipo de tratamiento _____

Inducción Si ☐ No ☐

Remisión Si ☐ No ☐

Otro _____

4. Tratamiento con Citarabina

Si ☐

No ☐

Inducción Si ☐ No ☐

Remisión Si ☐ No ☐

5. Tratamiento Antibiótico

Antibiótico presente ☐ ausente ☐

Tipo de Antibiótico _____

Duración (días) _____

6. Tratamiento Antimicótico

Antimicótico presente ☐ ausente ☐
Tipo de Antimicótico _____
Dosis _____

7. Neutropenia febril

Si ☐ No ☐

Recuento de Leucocitos: _____
Neutrófilos absolutos: _____
Duración de la neutropenia (días) _____
Fecha de recuperación _____

8. Curva térmica: _____**9. Otros Factores de riesgo**

Antecedentes de Cirugía Si ☐ No ☐
Tipo de Cirugía _____
Catéter Intravenoso Si ☐ No ☐
Hiperalimentación Si ☐ No ☐
Corticosteroides presente ☐ ausente ☐
Tipo de corticosteroides _____
Duración (días) _____
SRIS presente ☐ ausente ☐
Otro: _____

10. Imagen diagnóstica:

Si ☐ No ☐

Tipo _____
Impresión Diagnóstica: _____

11. Histopatología:

Si ☐ No ☐

Diagnóstico histopatológico _____

12. Cultivo Microbiológico

Si ☐ No ☐

Agente etiológico aislado _____

13. Niveles PCR: _____**14. Título de Manano (Ag):** ____ ng/dl

Interpretación de la prueba antigénica: Negativo ☐ Positivo ☐ Intermedio ☐

15. Criterio EOR-TC

Diagnóstico infección probada Si ☐ No ☐
Diagnóstico infección probable Si ☐ No ☐
Diagnóstico infección Posible Si ☐ No ☐

16. Observaciones:

