

112387
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRIA C.M.N. SIGLO XXI

"ESTUDIO COMPARATIVO DE FLUORESCENCIA DIRECTA CON BLANCO DE CALCOFLUOR vs INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA EN BUFFY COAT PARA EL DIAGNOSTICO DE CANDIDEMIA EN PACIENTES PEDIATRICOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIZACION EN
INFECTOLOGIA PEDIATRICA

P R E S E N T A :

DR. ERIC MOISES FLORES RUIZ



IMSS

MEXICO, D. F.

TUTORES: DR. HUMBERTO DIAZ PONCE
DR. FORTINO SOLORZANO SANTOS

J. M. S. S. C. M. N.
HOSPITAL DE PEDIATRIA
MAYO 3 1999
DEPTO. DE ENSEÑANZA
E INVESTIGACION

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Para mis padres Mauricio y Martha

Que me han dado todo.

A mi esposa e hija Brenda y Brenda Mercedes

Por su cariño y comprensión.

A mis maestros, miembros del servicio de Infectología, y muy en especial para mis tutores Dr. Humberto Díaz y Dr. Fortino Solórzano

Por su amistad y enseñanzas recibidas.

A mis compañeras Adriana, América y Azucena

Por su amistad, apoyo y el trabajo en grupo durante los dos años de la residencia.

A los miembros del Laboratorio de Bacteriología y Virología, Químicos:

Gustavo, Fausta, Maripaz y Teresa Alvarez.

Que con su apoyo se facilitó el desarrollo del estudio.

CONTENIDO

Resumen	3
Abstract	5
Antecedentes	6
Sujetos, Material y Métodos	10
Criterios de Inclusión	10
Criterios de Exclusión	11
Definiciones.....	11
Procedimientos.....	12
Análisis de los resultados.....	15
Resultados	16
Discusión	18
Bibliografía	22
Anexos	26

RESUMEN

Introducción: Las tasas de morbi-mortalidad por Candidosis invasiva y sistémica en pacientes inmunocomprometidos son altas. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas, por lo que en pacientes con factores de riesgo para estas complicaciones se recomienda tratamiento empírico. Existen pocas pruebas paraclínicas sensibles y específicas para el diagnóstico de estas enfermedades, especialmente pruebas cuya metodología sea sencilla, accesible y que consuma el menor tiempo posible para obtener los resultados. La inmunofluorescencia indirecta (IFA) en Buffy Coat permite el diagnóstico de candidemia en 3 horas con sensibilidad del 60%; se ha descrito una técnica con fluorescencia directa (FD) utilizando Blanco de Calcofluor con sensibilidad del 61%, realizándose en 30 minutos.

Objetivo: Evaluación de la utilidad de IFA vs FD con Blanco de Calcofluor para el diagnóstico de candidemia, y la concordancia entre ambas pruebas.

Material y Métodos. Se incluyeron pacientes pediátricos con sospecha de infección sistémica por *Candida*, a los que se les tomó muestra hemática para cultivo, FD e IFA; Se calculó la utilidad diagnóstica, así como la correlación entre ambas pruebas de fluorescencia mediante cálculo de Kappa.

Resultados. Se analizaron un total de 97 muestras, por la FD se encontraron 26 casos positivos, y la IFA detectó 18 casos positivos. 10 muestras fueron positivas por el estándar de oro. La FD tuvo sensibilidad y especificidad de 90 y 80% respectivamente. La IFA con sensibilidad y especificidad de 60 y 86% respectivamente. La concordancia entre las pruebas de fluorescencia fue $k = 0.65$ ($p < 0.001$).

Conclusiones: La FD es una prueba sensible y específica, fácil y rápida de realizar. Recomendamos esta prueba como una herramienta para el diagnóstico de Candidemia.

ABSTRACT

Introduction: Morbidity and mortality rates of Invasive and disseminated candidiasis are high in immunocompromised patients. Clinical findings are scarce and nonspecific, that is why empiric treatment is recommended in patients at risk for this complications. There is a lack of sensitive and specific tests for candidiasis, specially those nonexpensive, easy and fast to perform. Indirect immunofluorescence (IFA) in buffy coat allows diagnosis of candidemia in about 3 h and has a sensitivity of 60%; other fluorescent test is Calcofluor white (FD) with a sensitivity of 61 %, and takes 30 minutes to perform.

Objective: Evaluation of IFA and FD for diagnosis of candidemia and concordance between them.

Material and methods: Pediatric patients suspected to have candidemia were included. Blood samples were taken and were used for paired Buffy coat smears and cultures. Buffy coat smears were processed by IFA and FD. The value diagnostic of the test were calculated. The concordance between the test was calculated by Kappa.

Results: Ninety seven blood samples were analyzed. Candida was detected by FD in 26 blood samples, and in 18 by IFA. Ten samples fulfilled criteria of gold standard. FD had 90 % and 80 % of sensitivity and specificity, respectively. IFA had 60% and 86% of sensitivity and specificity, respectively. The concordance was $k=0.65$ ($p<0.001$).

Conclusion: FD is a sensitive, specific test, easy and a fast to perform. We recomend this test as a valuable tool in the diagnosis of candidemia.

ANTECEDENTES

Las micosis oportunistas son causadas principalmente por *Candida* sp y *Aspergillus* sp, de ellas la candidosis supera el 58%⁽¹⁻⁴⁾. Estas micosis ocupan el cuarto lugar de las infecciones nosocomiales representando 7-15% de estos eventos⁽⁵⁾. Estas infecciones se presentan especialmente en pacientes inmunocomprometidos ó en pacientes con factores de riesgo, como son la neutropenia, el uso de catéteres intravasculares, asistencia mecánica de la ventilación, nutrición parenteral, esteroides, quimioterapia, antibióticos de amplio espectro, etc. La frecuencia de este tipo de infecciones se ha incrementado en los últimos años con relación directa a los factores referidos^(1,3-5). Se requiere de un diagnóstico y tratamiento oportunos debido a que la candidosis invasiva y sistémica son enfermedades graves con mortalidad del 46 a 75%^(4,6).

Las manifestaciones clínicas de las candidosis invasiva y sistémica son inespecíficas^(1,3,7). En función de la dificultad para su diagnóstico, existe el consenso de que en pacientes con sospecha clínica y factores de riesgo se inicie tratamiento empírico con anfotericina B^(1,7).

Existen diversos métodos paraclínicos para el diagnóstico de candidosis invasiva y sistémica. El hemocultivo es considerado el estándar, sin embargo su sensibilidad es de 10-43% cuando se contrasta con estudios de autopsia^(8,9). El proceso de este método consume varios días para obtener el resultado; de ahí su baja utilidad para decidir el inicio o interrupción del tratamiento. Otros métodos empleados para el diagnóstico son la detección de anticuerpos IgA, IgM e IgG en suero con diversas técnicas (ELISA, Inmunodifusión, hemaglutinación, etc.),

tienen limitaciones debido a que los pacientes tienen una respuesta humoral errática, y la detección de estos anticuerpos no es prueba suficiente para asegurar que la respuesta humoral es debida a enfermedad actual; en el mejor de los casos la sensibilidad ha resultado de 83%⁽¹⁰⁾.

La detección de diversos componentes fúngicos como mannoпротеinas, índice D-arabinitol/L-artabinitol, (1→3)-Beta-D-glucan, aglutinación en látex, tubo germinativo, etc., tienen sensibilidades variables del 60 al 90%, con el inconveniente de que en pacientes colonizados por *Candida* se pueden observar resultados falsos positivos lo que disminuye la sensibilidad de las pruebas, ésta falla también se observa en pacientes diabéticos ó con insuficiencia renal ⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Para la identificación rápida de *Candida* en hemocultivos recientemente se han realizado ensayos con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con sensibilidad y especificidad de 100 y 98%, respectivamente; la realización del procedimiento requiere 7 hrs. y el aislamiento del microorganismo en hemocultivo, sin embargo los autores comentan acerca de la posibilidad de aplicar esta técnica en líquidos corporales normalmente estériles⁽¹⁶⁾. El alto costo de los métodos previamente descritos ha restringido el uso de los mismos a laboratorios de investigación.

Como es evidente son necesarias pruebas diagnósticas accesibles en cuanto a costo, confiabilidad, disponibilidad y rapidez. Ascuitto y colaboradores⁽¹⁷⁾ en 1985 utilizaron la tinción de Gram en extendido leucocitario (Buffy Coat) para la detección de levaduras en 3 pacientes, los resultados fueron positivos en muestras de sangre obtenidas a través de catéteres intravasculares. Cattermole y Rivers⁽¹⁸⁾ en 1987 reportan un caso similar positivo con la misma técnica en un recién nacido prematuro. En un estudio previo⁽¹⁹⁾ reportamos el desarrollo de una

técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFA) en extendido leucocitario la cual fue empleada en un modelo de candidosis sistémica en conejos y en pacientes con factores de riesgo para candidosis invasiva ó sistémica; en el modelo animal la sensibilidad y especificidad fueron de 60% y 100% cuando las muestras analizadas fueron tomadas de venas periféricas. En relación a las muestras clínicas IFA resultó positiva en 22/40 pacientes, y los hemocultivos fueron positivos en 4/40 pacientes estudiados.

El Blanco de Calcofluor es un compuesto que tiene afinidad por la quitina y los polisacaridos β 1-3, β 1-4 de la pared celular de los hongos. Este compuesto fluoresce al ser excitado con filtros de 380-425 nm, en microscopios de fluorescencia^(20,21). En 1984 Hageage y col.⁽²²⁾ utilizaron Blanco de Calcofluor y microscopía de fluorescencia en un estudio diseñado para la detección de hongos, las muestras clínicas fueron líquidos corporales y tejidos; la sensibilidad encontrada para su prueba fue del 76%, el estándar fueron cultivos. Thimmapuram y col.⁽²³⁾ en 1996 utilizaron fluorescencia directa (FD) con Blanco de Calcofluor en Buffy Coat para búsqueda de levaduras en muestras de sangre periférica de pacientes neonatos con factores de riesgo para candidosis invasiva o sistémica, la prueba resultó 61.5% sensible y 100% específica, el estándar fue el hemocultivo.

Las pruebas descritas que utilizan Fluorescencia tienen la ventaja de que son rápidas, muestran al observador el agente, en este caso levaduras. Su limitante es que solo se pueden desarrollar en los sitios en que se cuente con microscopios de fluorescencia.

Dado que se desconoce cual de las pruebas de fluorescencia es la de mayor utilidad en el diagnóstico de Candidosis invasiva y sistémica, el objetivo de este

estudio ha sido el de evaluar la utilidad de ambas pruebas y compararlas. En este caso se utilizó como estándar a la identificación de *Candida* spp en hemocultivo, necropsia ó cultivo de punta catéter intravascular.

SUJETOS, MATERIAL Y METODOS

Se evaluó y comparó la utilidad diagnóstica de IFA y FD.

Sitio: Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS.

Aceptado por el comité local de investigación con en N° 98/718/29

Periodo: La recolección de las muestras se llevó a cabo en forma transversal, prospectiva de Octubre de 1998 a Febrero de 1999 en pacientes con sospecha de Candidemia o Candidosis sistémica.

Criterios de inclusión:

Pacientes con edad comprendida de recién nacido a 16 años que presenten datos clínicos de infección sistémica^(24,25), con dos ó más de los siguientes factores predisponentes y condiciones clínicas:

a) Factores predisponentes:

1. Tratamiento con antibióticos de amplio espectro por 5 días o más.
2. Presencia de catéter intravascular por mas de 3 días.
3. Intubación por mas de 3 días.
4. Neutropenia menor de 500. neutrofilos absolutos/ml⁽⁷⁾.
5. Desnutrición⁽²⁶⁾.
6. Enfermedad neoplásica hemato-oncológica.
7. Prematurez en el caso de recién nacidos.

b) Condiciones clínicas:

1. Sin respuesta al manejo antibacteriano después de 96 hrs.

2. Radiografía de tórax con infiltrados que no mejoran, o la aparición de nuevos infiltrados durante manejo antimicrobiano.
3. Candidiasis oroesofágica.
4. Pacientes con mejoría inicial que presenten deterioro clínico inexplicable (sospecha de sepsis) mientras están recibiendo antimicrobianos.

Criterios de eliminación:

1. Pacientes a quienes no se hayan tomado simultáneamente las muestras para hemocultivo, IFA y FD.
2. Muestras inadecuadas.

DEFINICIONES OPERACIONALES

Se definió como candidemia la presencia de *Candida* spp en muestras de sangre circulante y su identificación por los siguientes métodos:

Estándar

- Hemocultivos: Se considero positivo el crecimiento de *Candida* sp durante un periodo de observación de 20 días de los hemocultivos, se considero negativo la ausencia de crecimiento de *Candida* sp, ó el crecimiento de otros microorganismos.
- Cultivo de punta de catéter intravascular: Se considero positivo el crecimiento de *Candida* sp durante un periodo de observación de 20 días, se considero negativo la ausencia de crecimiento de *Candida* sp, ó el crecimiento de otros microorganismos.

- Estudios histopatológicos (necropsia, biopsias): se consideró positivo la identificación de *Candida* sp en al menos un órgano interno, y negativo la ausencia de éstas.

Técnicas de fluorescencia

- Ambas técnicas aplicadas en el Buffy Coat se consideraron positivas al observar levaduras o pseudomicelios con pared celular bien definida e intensamente fluorescentes. El resultado se consideró negativo cuando no se observaron estructuras como las previamente descritas ó si la fluorescencia no permitía delimitar forma alguna.

PROCEDIMIENTOS

Muestras clínicas:

A los pacientes con sospecha de candidosis invasiva que cumplieron los criterios de inclusión, se les tomó muestra hemática con técnica aséptica para hemocultivo y realización de extendidos leucocitarios.

Hemocultivo: Se tomaron 0.2 ml de sangre circulante en el caso de neonatos, y 2 ml en pacientes después del periodo neonatal, inoculándose inmediatamente en condiciones asépticas en caldo de cultivo BHI, ó medio de cultivo del Sistema Bactec para su incubación a 37 °C, posteriormente se realizaron resiembras en placas de Agar Gelosa sangre, Chocolate, McConkey y Sabouraud, vigilando desarrollo de microorganismos a las 24, 48 y 72 hrs. Los cultivos primarios se mantuvieron en incubación hasta un periodo máximo de 20 días, se desecharon si continuaban negativos en este periodo de tiempo. Se consideró positivo el

crecimiento de *Candida* sp, tomando como negativo el crecimiento de otros microorganismos, o la ausencia de crecimiento de colonias de *Candida* sp.

Cultivo de punta de catéter intravascular: A los pacientes que tuvieran catéter intravascular y fuera retirado con técnica aséptica por indicación médica durante el periodo clínico de sospecha de candidemia se procedió a su cultivo con técnica de rodamiento en Agar gelosa sangre y su incubación a 37°C durante 72 hrs. valorandose en búsqueda de crecimiento de microorganismos cada 24 hrs. Se considero positivo el crecimiento de *Candida* sp, considerandose negativo el crecimiento de otros microorganismos, ó la ausencia de desarrollo de microorganismos.

Obtención del Buffy Coat: Se colocó 1 ml de sangre en un tubo de Wintrobe con capacidad para 1 ml, se centrifugó a 4000 r.p.m. en una centrifuga "Easy Spin" durante 7 minutos. Con una pipeta Pasteur se extrajo el suero, y posteriormente tomó el concentrado leucocitario colocándose muestra en un portaobjetos para cada técnica de fluorescencia (en los casos en que no se apreciaba capa leucocitaria se tomó la interfase entre el suero y los glóbulos rojos), se fijó al calor para su posterior procesamiento con las diferentes técnicas de fluorescencia.

Fluorescencia directa con blanco de Calcofluor: Se preparó el reactivo Blanco de Calcofluor utilizando FLUORESCBNT BRIGHTENER 28 (Blanco de Calcofluor M2R), SIGMA 0.05 g + Azul de Evans 0.02 g + Agua destilada 50 ml (una vez preparado es estable por 6 meses); a las muestras de Buffy Coat se les realizaron dos lavados de dos minutos en PBS 1x con el propósito de adelgazar el

extendido leucocitario para facilitar su observación. Se aplicó una gota del reactivo Blanco de Calcofluor sobre el extendido leucocitario, y se colocó un cubreobjetos; posteriormente se procedió a la observación inmediata antes de su desecación, en un microscopio de fluorescencia "Nikon" con un filtro Epi-FL V2A(BA 450/BM 430/EX 380-425) con el objetivo 40x. Se consideró **positiva** al observar levaduras o pseudomicelios con pared celular bien definida e intensamente fluorescentes. El resultado se consideró negativo cuando no se observaron estructuras como las previamente descritas ó si la fluorescencia no permitía delimitar forma alguna.

Inmunofluorescencia Indirecta: A la muestra de Buffy Coat previamente obtenida se le aplicó un anticuerpo anticandida (IgG) obtenido de conejo (diluido en PBS 1x 1:20), se incubó en cámara húmeda durante 45 minutos a 37 °C, se lavó por inmersión en PBS 1x durante 10 minutos en dos ocasiones y se enjuagó con agua estéril; se colocó un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con Fluoresceína (diluido en PBS 1x 1:20) incubándose nuevamente en cámara húmeda a 37°C durante 45 minutos, se lavó por inmersión en PBS 1x durante 10 minutos en dos ocasiones y se enjuagó con agua estéril, se colocó una gota de aceite de montaje y se cubrió con un portaobjetos, se observó en un microscopio de fluorescencia "Nikon" con un filtro B2A (BA 520/DM 510/ EX 450-490) con el objetivo 40x. Se consideró **positiva** al observar levaduras o pseudomicelios con pared celular bien definida e intensamente fluorescentes. El resultado se consideró negativo cuando no se observaron estructuras como las previamente descritas ó si la fluorescencia no permitía delimitar forma alguna.

Se realizaron controles positivos utilizando colonias de *Candida sp* para realizar extendidos, y controles negativos para cada método de fluorescencia cada vez que se realizó el procedimiento.

ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Se tomó un tamaño de muestra de 100 pacientes en base a una hipótesis de no diferencia. Se realizó evaluación de prueba diagnóstica^(27,28,29) para las dos pruebas de fluorescencia con cálculo de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y exactitud, se calcularon intervalos de confianza, y razones de verosimilitud (RV) para la sensibilidad y especificidad; se consideró como Estándar de oro el aislamiento de *Candida sp* en una o más de las siguientes pruebas: hemocultivo, cultivo de punta de catéter intravascular, ó la identificación del microorganismo en estudios histopatológicos.

Se valoró concordancia entre ambas pruebas de fluorescencia mediante el cálculo de Kappa considerándose adecuada una concordancia mayor de 0.61 y $p < 0.05$ ⁽³⁰⁾.

RESULTADOS

Durante el período del estudio se incluyeron 86 pacientes, realizándose 111 pruebas en total, siendo eliminadas 14 pruebas por no cumplir con los criterios de inclusión, realizándose el análisis con 97 pruebas. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 1. Se obtuvieron 39 muestras de pacientes neonatos, y 58 de pacientes mayores a este grupo de edad. Las enfermedades infecciosas subyacentes predominantes, en neonatos fueron neumonía (24) y sepsis (12), con antecedente de prematuridad en 23 casos; después del período neonatal los principales diagnósticos fueron: Neutropenia y fiebre prolongada (23), sepsis abdominal (17), neumonía (13), con antecedente de enfermedad hemato-oncológica en 39 de los casos. Se identificó *Candida* sp en 10 pacientes, en 5 fue por hemocultivo, 4 cultivos de catéter intravascular, y en un caso de necropsia identificando neumonía por *Candida*. Las especies correspondieron en 4 casos a *Candida albicans* y en 5 a *Candida no albicans*.

Fluorescencia directa: Esta prueba resultó positiva en 26 pacientes, un ejemplo de una muestra clínica positiva se muestra en la figura 1. Los resultados positivos concordaron con los aislamientos de *Candida* sp en los 5 hemocultivos y 4 cultivos de catéteres intravasculares en que se identificó el microorganismo, siendo negativa (al igual que el hemocultivo) en el caso del diagnóstico por necropsia de neumonía por *Candida*, la sensibilidad y especificidad fue de 90% y 80% respectivamente (Tabla 2 y 3).

Inmunofluorescencia indirecta: Esta prueba resultó positiva en 18 ocasiones, concordando positividad con el aislamiento de *Candida* sp en 3 hemocultivos y en 3 aislamientos en cultivo de catéter intravascular, siendo negativa en el caso de

dos hemocultivos y un cultivo de catéter intravascular que mostraron desarrollo de *Candida* sp, así mismo negativa en el estudio de necropsia con diagnóstico de neumonía por *Candida*, resultó con una sensibilidad y especificidad del 60% y 86% respectivamente (Tabla 2 y 3).

La concordancia entre ambas pruebas de fluorescencia por la fórmula de Kappa fue de $k= 0.65$ ($p < 0.001$). (Tabla 4)

La prevalencia de candidemia en este estudio fue del 10%. Al hacer el análisis probabilístico se tiene una posibilidad preprueba de 10% para la presencia de candidemia. Para FD con blanco de calcoflour se obtuvo una razón de verosimilitud de 4.5 veces más de tener un resultado positivo en un paciente con candidemia, lo cual resultó en una probabilidad posprueba de 31% para la presencia de la enfermedad mediante el análisis en el Nomograma de Bayes. Con resultado negativo, la razón de verosimilitud fue de 0.12, con una probabilidad posprueba de 1.1% para la presencia de la enfermedad (Figura 2). Para la IFA con un resultado positivo se obtuvo una razón de verosimilitud de 4.2, con lo que resultó una probabilidad posprueba del 29%. Con resultado negativo la RV fue de 0.46 y la probabilidad posprueba de 3.7% (Figura 3).

DISCUSION

Las enfermedades invasivas y sistémicas por *Candida* se han incrementado en la actualidad, su diagnóstico clínico es difícil por lo que se requiere de pruebas paraclínicas que permitan el diagnóstico temprano y oportuno⁽¹⁻⁷⁾. Existen diversos métodos paraclínicos, sin embargo los de mayor utilidad no están asequibles más que a laboratorios de investigación.⁽¹⁰⁻¹⁶⁾ Los hemocultivos en general disponibles en la mayoría de los hospitales, tienen una sensibilidad variable, de 10-47%^(8,9) y requieren un mínimo de 24-48 hrs. para mostrar resultados positivos. Por lo anterior se requiere contar con técnicas rápidas, confiables, accesibles y de bajo costo para el diagnóstico de Candidemia. En nuestro hospital se utiliza desde 1995 una técnica de Inmunofluorescencia Indirecta en Buffy Coat que permite el diagnóstico de Candidemia en 3 horas con una sensibilidad del 60%⁽¹⁹⁾. En 1996 se reportó el uso de una técnica similar en neonatos, utilizando fluorescencia directa con Blanco de Calcofluor con una sensibilidad del 61.5%⁽²³⁾.

En este estudio se compararon ambas pruebas para establecer su sensibilidad y especificidad, utilizando el hemocultivo como estándar de oro. Como es conocida la baja sensibilidad del hemocultivo incluyeron dentro del estándar aislamientos de *Candida* sp en cultivos de punta de catéteres intravasculares ó su identificación en estudios histopatológicos para lograr incrementar los casos positivos.

Durante el estudio se analizaron 97 muestras, de las cuales sólo en 10 casos se estableció definitivamente el diagnóstico de Candidemia, de estos la mitad tuvieron hemocultivo positivo, el resto en cultivo de punta de catéter intravascular y un caso posmortem en necropsia.

En cuanto a las técnicas de fluorescencia se encontró una mayor sensibilidad para la FD que para la IFA siendo de 90 y 60% respectivamente; no encontramos ninguna falla para la FD al compararla con los aislamientos de *Candida* sp en hemocultivo y cultivo de catéteres, solamente con falla en un caso de diagnóstico de neumonía por *Candida* mediante necropsia. En cuanto a la IFA hubo falla para la detección de Candidemia en dos casos identificada por hemocultivo, en un caso en cultivo de catéter intravascular, y en el caso de la necropsia, lo que demuestra una mayor sensibilidad de la FD para el diagnóstico de Candidemia. Al analizar la especificidad y la exactitud estas son ligeramente mayores para la IFA, probablemente debido a la baja sensibilidad del estándar, por lo que casos de Candidemia que no son detectados por el estándar, y si son detectados por las técnicas fluorescencia tienen que ser considerados como falsos positivos, y teniéndose una menor detección de casos por la técnica de IFA la hace resultar mas especifica que la FD y ocasionar los valores encontrados, aunque son conceptos que no se pueden asegurar por la baja sensibilidad del estándar, y seguramente una situación similar aunque de menor grado ocurre con la FD. En este estudio la sensibilidad de la FD fue más alto que el reportado por Thimmapuram⁽²³⁾.

Al analizar las razones de verosimilitud y la posibilidad posprueba para la presencia o ausencia de la enfermedad ante resultados positivos ó negativos los encontramos en niveles bajos (tabla 3, Fig. 2 y 3), pero aun así proporcionan

información importante. La razón de verosimilitud se calcula a partir de la sensibilidad y especificidad, y utilizando la posibilidad preprueba permite en conjunto calcular la posibilidad posprueba; nuevamente la baja sensibilidad del estándar puede ser la causa de los resultados observados por el incremento probablemente no real de resultados falsos positivos.

Al hacer el análisis de concordancia entre las pruebas de fluorescencia mediante el cálculo de Kappa se encontró una excelente concordancia $k = 0.65$ ($p < 0.001$) lo que demuestra la reproducibilidad de las pruebas, esto sumado a los valores de sensibilidad y especificidad encontrados en el estudio establece una mayor utilidad de la fluorescencia directa para el diagnóstico de candidemia.

Si contrastamos la FD con la IFA, y con la IFA más el estándar se mantienen prácticamente sin cambios los valores de sensibilidad y especificidad encontrados, y se incrementa en forma importante el valor predictivo positivo de la prueba, la posibilidad posprueba, así como la exactitud y las razones de probabilidad. Esto es posible ya que las pruebas de fluorescencia muestran en forma objetiva la presencia del microorganismo, por lo que podrían ser utilizadas en estudios futuros como el estándar de oro (tabla 5).

El costo calculado por prueba de FD es menor de USD\$0.50, la estabilidad del reactivo una vez preparado es de 6 meses, y el tiempo de procesamiento es aproximadamente de 30 minutos, con una sensibilidad encontrada en este estudio del 90%, y superior al hemocultivo en aproximadamente un 44% lo que la hacen una prueba rápida, accesible y confiable.

En conclusión los datos encontrados en este estudio demuestran una mayor eficacia de la Fluorescencia directa para el diagnóstico de Candidemia, con una mayor rapidez y facilidad en el proceso que la Inmunofluorescencia indirecta, por lo que recomendamos su uso para el diagnóstico de Candidemia en pacientes con factores de riesgo para esta enfermedad. Es necesario realizar otros estudios que incluyan mayor número de pacientes y un mejor estándar para conocer la utilidad real de la prueba.

BIBLIOGRAFIA

1. Rein S. Candida and Aspergillus infections in Immunocompromised Patients: An Overview. *Rev Infect Dis* 1991;13: 487-92.
2. Bodey G, Bueltmann B, Duguid W, Gibbs D, Hanak H, Hotchi M, Mall G, Martino P, Meunier F, Milliken S. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11(2): 99-109.
3. Füssle Roswitha. Diagnosis of Fungal infections. *Mycoses* 1997;40:13-15 Sup
4. Wenzel RP. Nosocomial Candidemia: Risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995;20: 1531-4.
5. Rentz AM, Halpern MT, Bowdwn R. The impact of Candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis* 1998;27: 781-788.
6. Rex JH, Bennet JE, Sugar AM, Pappas PG, Vaan Der Horst CM, Edwards JE, Washburn RG, Scheld WM, Karchmer AW, Dine AP, Levenstein MJ, Webb CD. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of Candidemia in patients without neutropenia. *N Engl J Med* 1994;17(20): 1325-30.
7. Hughes WT, Chairman, Armstrong D, Bodey GP, Brown AE, Edwards JE, Feld R, Pizzo P, Rolston KVI, Shenep JL, Young LS. 1997 Guidelines for the use of Antimicrobials Agents in Neutropenic Patients with Unexplained Fever. *CID* 1997;25: 551-73.
8. Berenguer J, Buck M, Witebsky F, Stock F, Pizzo PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive

- candidiasis. Disseminated versus single-organ infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17(2): 103-9
9. Bille J, Stockman L, Roberts GD. Detection of yeast and filamentous fungi in blood cultures during a 10-year period (1972-1981). *J Clin Microbiol* 1982; 16: 968-70.
 10. Klingspor L, Stintzing G, Tollemar J. Deep Candida infection in children with leukaemia: clinical presentations, diagnosis and outcome. *Acta Paediatr* 1997;86: 30-6.
 11. Girmenia C, Martino P, Bernardis F, Cassone A. Assessment of detection of Candida Mannoproteinemia as a method to differentiate central venous Catheter-Related Candidemia from invasive disease. *J Clin Microbiol* 1997;35(4): 903-6.
 12. Lehtonen L, Anttila VJ, Ruutu T, Salonen J, Nikoskelainen, Eerola E, Ruutu P. Diagnosis of disseminated Candidiasis by measurement of urine D-Arabinitol/L-Arabinitol Ratio. *J Clin Microbiol* 1996;34(9): 2175-9.
 13. Christensson B, Wiebe T, Pehrson C, Larsson L. Diagnosis of invasive Candidiasis in neutropenic children with cancer by determination of D-Arabinitol/L-Arabinitol Ratios in urine. *J Clin Microbiol* 1997;35(3): 636-40.
 14. Hossain MA, Miyazaki T, Mitsutake K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kawamura S, Otsubo T, Hirakata Y, Tashiro T, Kohno S. Comparison between Wako-WB003 and Fingitec G tests for detection of (1→3)-beta-D-glucan in systemic mycosis. *J Clin Lab Anal* 1997;11(2): 73-7.
 15. Garcia-Ruiz JC, Arilla MC, Regúlez P, Quindos G, Alvarez A, Ponton 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(12): 3284-7.
16. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* Species in blood cultures by a clinically useful PCR Method. *J Clin Microbiol* 1997;35(6): 1454-9.
17. Ascutto RJ, Gerber MA, Cates KL, Tilton RC. Buffy Coat smears of blood drawn through central venous catheters as an aid to rapid diagnosis of systemic fungal infections. *J Pediatr* 1985;106(3): 445-7.
18. Cattermole HEJ, Rivers RPA. Neonatal *Candida* Septicaemia: diagnosis on buffy smear. *Arch Dis Child* 1987;62: 302-4.
19. Diaz-Ponce H, Solorzano-Santos F, Ruiz-Rodriguez A, Sanchez-Huerta G, Rosas-Macedo S, Aleman-Velazquez P, Torres JF, Muñoz O. Indirect Immunofluorescent Assay (IFA) in Buffy Coat as a rapid diagnostic test for Invasive Candidiasis. *Arch Med Res* 1995;26: S41-6.
20. Maeda H, Ishida N. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J Biochem* 1967;62: 276-8.
21. Borg-von M, Wagner T. Fluorescence assay for the detection of adherent *Candida* yeast to target cells in microtest plates. *Mycoses* 1995;38: 339-347.
22. Hageage GJ, Harrington BJ. Use of Calcofluor White in clinical Mycology. *Lab Med* 1984;15(2): 109-112.
23. Thimmapuram C, Arunaloke C, Meenu S, Sunit S. Role of Buffy Coat examination in the diagnosis of Neonatal Candidemia. *Pediatr Inf Dis J* 1996;15(8): 718-20.

24. American college of Chest Physicians-Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992;20: 864-75.
25. Mathur NN, Singh A, Sharma VK., Satyanarayana L. Evaluation of risk factors for fatal neonatal sepsis. Indian Pediatr 1996;33: 817-22.
26. Gomez F. Desnutrición. Bol Med Hosp Infant Mex 1946;3(4): 543-51.
27. Galva-Mercado J, Ponce de Leon-Rosales S, Ponce de Leon-Rosales S, Vargas-Vorágkova F. COMO LEER REVISTAS MEDICAS. II Para aprender sobre una prueba diagnóstica. Rev Invest Clin 1988;40: 73-83.
28. Terrence JF. N Engl J Med 1978;293: 257.
29. Sackett LD. The interpretation of diagnostic data, 59-138. En: Clinical epidemiology, 1ª Edición, 1985.
30. Fajardo-Gutierrez A, Yamamoto-Kimura LT, Garduño-Espinoza J, Hernández-Hernández DM, Martínez-García MC. Consistencia y validez de una medición en la investigación clínica pediátrica. Definición, evaluación y su interpretación. Bol Med Hosp Infant Mex 1991;48(5): 367-81.

A N E X O S

Tabla 1. Características de los pacientes.

	NEONATOS n= 39	DESPUES DEL PERIODO NEONATAL n= 58
Edad Md	29 (7-76)	8 (1m-15a)
Estancia(días) Md	20 (3-76)	14 (2-107)
Sem.edad gest. Md	32 (27-40)	-
Peso Kg Md	1.3 (0.6-3.5)	22 (1.9-80)
Sexo M:F	22:17	25:33
Desnutrición %	79	47
CVC (%)	54	33
Fiebre (%)	31	78
NPT (%)	82	22
Antimicrobiano (%)	87	88
AMV	74	14
Leucocitos/ml Md	12900 (4200-45000)	1625 (100-62700)
Neutrofilos/ ml Md	6370 (2496-22703)	920 (0-48906)
Linfocitos/ ml	4308 (900-12600)	455 (8-13950)
Plaquetas/ml Md	110600 (7000-423000)	38500 (4000-556000)
Hb(gr/dl) Md	11.5 (7.8-17)	10.9 (5.6-15)

En éste cuadro se muestran las principales características clínicas y de laboratorio de los pacientes incluidos en el estudio, se dividen en dos grupos: pacientes neonatos y pacientes mayores a 28 días hasta menores de 16 años.

Tabla 2. Tablas de contingencia para ambas pruebas de fluorescencia para análisis de prueba diagnóstica.

		Estándar		
		(+)	(-)	
FD	(+)	9	17	26
	(-)	1	70	71
		10	87	97

		Estándar		
		(+)	(-)	
IFA	(+)	6	12	18
	(-)	4	75	79
		10	87	97

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Tabla 3. Valores diagnósticos para las pruebas de fluorescencia

Prueba	Fluorescencia directa			Inmunofluorescencia indirecta		
	%	IC 95% ³	RV ⁴	%	IC 95%	RV
Sensibilidad	90	72-100	4.5	60	30-90	4.2
Especificidad	80	72-88	0.12	86	79-93	0.46
VPP¹	35	17-53	NC ⁵	33	12-54	NC
VPN²	99	97-100	NC	95	91-99	NC
Exactitud	81	74-88	NC	83	76-90	NC
Prevalencia	10	NC	NC	10	NC	NC

¹Valor predictivo positivo

²Valor predictivo Negativo

³Intervalo de confianza a 95%

⁴Razón de verosimilitud

⁵No calculado

Tabla 5. Diferentes valores diagnósticos de FD contrastada con IFA y el estándar

	FD vs ESTÁNDAR	FD vs IFA	FD vs IFA+ ESTÁNDAR
Sensibilidad	90 %	89 %	86 %
Especificidad	80 %	87 %	91 %
VPP ¹	35 %	62 %	73 %
VPN ²	99 %	97 %	96 %
Exactitud	81 %	88 %	90 %
Prevalencia	10 %	19 %	23 %
RV ³ (+)	4.6	7.02	8.4
RV (-)	0.12	0.12	0.17
P ⁴ . Posprueba (+)	32 %	59 %	71 %
P. Posprueba (-)	1 %	2 %	0.4 %

¹Valor predictivo positivo

²Valor predictivo Negativo

³Razón de verosimilitud

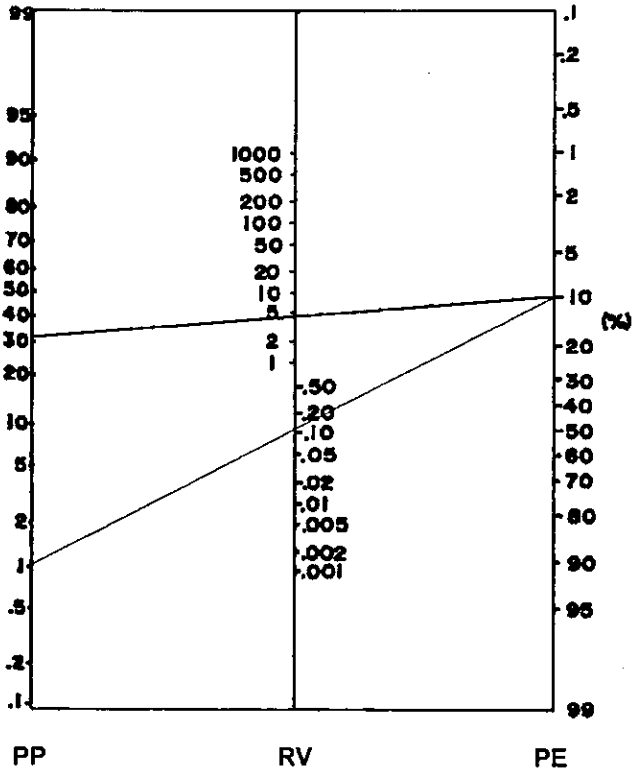
⁴Posibilidad

Figura 1. Imagen de levaduras en muestra clínica de Fluorescencia directa.



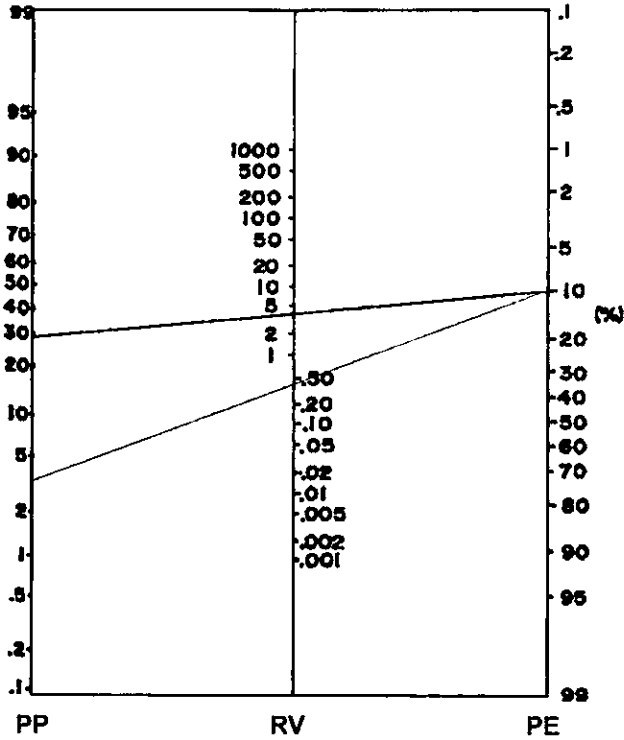
Las imágenes de levaduras en la fotografía corresponden a las estructuras ovales con pared definida más fluorescente que el centro, se aprecian también células hemáticas que muestran fluorescencia en forma inespecífica.

Figura 2. Nomograma de Bayes para Fluorescencia Directa.



En el lado derecho se muestran los valores correspondientes a prevalencia de la enfermedad (PE), en el centro los valores corresponden a las razones de verosimilitud de la prueba (RV), y en el lado izquierdo se muestra la probabilidad posprueba (PP). La línea gruesa corresponde al análisis con el resultado positivo de la prueba. La línea delgada muestra los valores con resultado negativo de la prueba.

Figura 3. Nomograma de Bayes para Inmunofluorescencia Indirecta.



En el lado derecho se muestran los valores correspondientes a prevalencia de la enfermedad (PE) , en el centro los valores corresponden a las razones de verosimilitud de la prueba (RV), y en el lado izquierdo se muestran los valores de tener la enfermedad posprueba (PP). La línea gruesa corresponde al análisis con el resultado positivo de la prueba. La línea delgada muestra los valores con resultado negativo de la prueba.