

112387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

2

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

"FLUORESCENCIA DIRECTA CON BLANCO DE CALCOFLUOR EN BUFFY COAT PARA EL DIAGNOSTICO DE CANDIDEMIA: ESTUDIO DE FASE V"

T E S I S

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIZACION EN INFECTOLOGIA PEDIATRICA

P R E S E N T A :

DR. VICTOR MANUEL CRESPO SANCHEZ

I. M. S.
Hospital de Pediatría
MAR 27 2002
TUTOR DR. ERIC MOISES FLORES RUIZ
COMITE TUTORIAL: DR. FORTINO BOLORZANO SANTOS
DRA. BERNIA GUADALUPE MIRANDA NOVALES
DR. HUMBERTO DIAZ PONCE



MEXICO, D.F.

2002



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.

Proyecto financiado parcialmente por el FOFOI: FP 0038/800

Comité local de investigación: No. 98/718/29

/

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres:

Juan Crespo Valladolid (+)
Genoveva Sánchez González

Por todo su apoyo durante mi formación profesional.

A mis Hermanos:

Que con su ayuda he logrado concluir una meta más en mi vida.

A MI TUTOR:

DR ERIC MOISES FLORES RUIZ

Por su valiosa cooperación en la realización de este trabajo, culminación de una meta más en mi vida profesional; y en especial por ser uno de los mejores amigos durante mi formación académica.

A mis Profesores:

DR FORTINO SOLORZANO SANTOS
DRA MARIA GUADALUPE MIRANDA NOVALES
DRA RITA DELIA DIAZ RAMOS
DR GUILLERMO VAZQUEZ ROSALES
DR GERARDO DEL CARMEN PALACIOS SAUCEDO
DR HUMBERTO DIAZ PONCE

Por todo el apoyo recibido para mi formación profesional en mi segunda especialidad: INFECTOLOGIA PEDIATRICA.

AL PERSONAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DEL HOSPITAL
DE PEDIATRIA CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.

Por su apoyo en la realización de este trabajo

En especial: TLC BLANCA LEAÑOS MIRANDA

Por su amistad, hoy y siempre.

INDICE

Resumen.....	4
Antecedentes.....	5
Justificación.....	11
Planteamiento del problema.....	12
Objetivo.....	13
Hipótesis.....	14
Material y métodos.....	15
Descripción general del estudio.....	16
Resultados.....	19
Discusión.....	22
Conclusiones.....	25
Bibliografía.....	26

Introducción: La candidiasis en pacientes de alto riesgo tiene una presentación clínica inespecífica y una mortalidad elevada; su diagnóstico clínico es difícil lo que amerita en muchas ocasiones manejo empírico con drogas antifúngicas las cuales resultan ser altamente tóxicas. Existen pocas pruebas de laboratorio sensibles y específicas para el diagnóstico de esta enfermedad, el hemocultivo tiene sensibilidad de 30%, en las pruebas rápidas la Fluorescencia directa con Blanco de Calcofluor en extendido leucocitario (Buffy coat) ha reportado sensibilidad y especificidad de 90 y 80% respectivamente.

Objetivo: Evaluar la prueba de Fluorescencia Directa (FD) con blanco de calcofluor en Buffy coat para el diagnóstico de candidemia en pacientes pediátricos en la práctica clínica habitual.

Diseño: Estudio de prueba diagnóstica en Fase V.

Sitio de realización: Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Material y métodos: Se incluyeron pacientes pediátricos con sospecha de candidemia. Se tomó simultáneamente muestra para hemocultivo y prueba de FD dando como prueba positiva la visualización de imágenes fluorescentes con morfología compatible a levaduras o pseudomicelios. Se consideró caso de candidemia al tener hemocultivo con desarrollo de *Candida* spp y/o respuesta clínica a terapia antimicótica ó aislamiento de *Candida* en sitios normalmente estériles. **Resultados:** se analizaron un total de 151 muestras, se confirmaron 19 casos de candidemia, la FD fue positiva en 21 muestras, concordando en 16 casos con el estándar, hubo 3 falsos negativos y 5 falsos positivos; los valores fueron: sensibilidad 84%, especificidad 96%. El costo por prueba aproximado es de \$6.00 y un tiempo de realización de 30 minutos.

Conclusiones: La prueba de FD tiene mayor sensibilidad que el hemocultivo, es una prueba rápida, accesible y poco costosa en el diagnóstico temprano de Candidemia que permiten al clínico ofrecer un tratamiento antifúngico temprano en pacientes de alto riesgo.

FLUORESCENCIA DIRECTA CON BLANCO DE CALCOFLUOR EN BUFFY COAT PARA EL DIAGNOSTICO DE CANDIDEMIA: Estudio de Fase V.

ANTECEDENTES

Candida spp. habitualmente es un microorganismo ubicuo, que puede encontrarse en el suelo, objetos inanimados, alimentos, etc; puede formar parte de la biota normal en el humano encontrándose desde un 6% en recién nacidos hasta un 45% en adultos sanos (1). *Candida* spp. es un microorganismo oportunista, que en condiciones de inmunosupresión ocasiona infecciones graves que ponen en peligro la vida del paciente. Existen más de 150 especies de *Candida*, pero solo se han descrito un poco más de 12 especies como causa de enfermedad, siendo *C. albicans* la especie aislada con mayor frecuencia. La epidemiología de las micosis invasivas ha sido caracterizada como una complicación predominantemente nosocomial o acontecida en una población de alto riesgo; en la década pasada Mac Donald y col (3) en un hospital pediátrico de Michigan reportaron que el índice de candidemia nosocomial ascendió de 12 infecciones por 1,000 días-paciente en 1989 a 276 infecciones por 1,000 días- paciente en 1993. Estudios más recientes han demostrado que *Candida sp.* es el cuarto agente

etiológico recuperado en hemocultivos de pacientes hospitalizados, constituyendo el 8% de todas las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo a nivel nacional en los Estados Unidos de Norteamérica; con una mortalidad variable que llega a ser hasta 80-85% (4,5). Durante los años 1990 y 1991, en México Pérez Miravete y col. (6) encontraron que la tasa de incidencia de candidiasis nosocomial fue de 56/10,000 egresos siendo *Candida albicans* el hongo más frecuentemente aislado; en el año 2000 en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI) *Candida spp* tuvo una tasa de incidencia de 101/10,000 egresos, siendo el 4º agente etiológico más frecuentemente recuperado en hemocultivos(7).

Existen factores que tienen influencia predominante en el cambio de la epidemiología de las enfermedades fúngicas: primero; el incremento en el número de pacientes que reciben quimioterapia (enfermedades oncológicas), y pacientes que reciben trasplantes de órganos sólidos que requieren de terapia con agentes inmunosupresores donde la neutropenia es un factor decisivo para que ocurra candidiasis sistémica (8,9). Segundo, el incremento en el uso de dispositivos invasivos, como los catéteres intravasculares temporales o permanentes, nutrición parenteral en pacientes sometidos a ayuno prolongado, pacientes que reciben esquemas antimicrobianos de amplio espectro, entre otros; también ha favorecido la infección por *Candida sp.* (10). Otro grupo de pacientes en los que es frecuente la

infección por *Candida sp.* son aquellos con quemaduras graves, y los recién nacidos prematuros hospitalizados por largo tiempo en unidades de cuidados intensivos (11,12).

El diagnóstico clínico de la candidiasis invasiva es difícil debido a que las manifestaciones clínicas son inespecíficas; los métodos microbiológicos convencionales usualmente tienen baja sensibilidad y especificidad. El hemocultivo es el método microbiológico más empleado; se han encontrado sensibilidades que van del 10 hasta un 43% comparado con estudios de autopsias, el tiempo promedio para obtener resultados varía de 48 a 72 h (13).

Otras técnicas que se han utilizado en el diagnóstico de candidiasis invasiva es la detección de anticuerpos (IgG, IgM, IgA, por ELISA, Hemoaglutinación entre otros), en 1997 García Ruiz y col. (14) en un estudio de diagnóstico y seguimiento terapéutico de candidiasis invasiva en pacientes con enfermedades hematológicas mediante la detección de anticuerpos contra tubo germinativo de *C. albicans* por inmunofluorescencia indirecta reportó una sensibilidad de 87.5% y especificidad de 95.2%, comparada con el aislamiento de *Candida sp.* en distintos sitios y fluidos corporales. Éstos métodos tienen la limitante de que la respuesta inmunológica de los pacientes estudiados usualmente es errática y los resultados pueden no reflejar el estado actual de la infección.

La detección de antígenos citoplasmáticos y de pared celular de *Candida* (mannoproteínas, enolasa, 1-3-β-D-glucano, entre otros), así como la cuantificación del índice de metabolitos fúngicos como D-arabinitol/L-arabinitol tanto en suero como en orina, han reportado sensibilidades variables de un 80 a 90%; cabe mencionar que estas pruebas en pacientes colonizados por *Candida* sp. sin enfermedad, pueden llegar a presentar resultados falsos-positivos.(15-20).

Existen otras pruebas diagnósticas actualmente dentro del campo de la biología molecular tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (21-24). En un estudio de Morace y col (25) utilizando PCR por análisis de restricción enzimática comparada contra el hemocultivo por el sistema automatizado BACTEC, reportó una sensibilidad de 92.7% vs 21.4% y un valor predictivo negativo de 97.5% vs 83.8%. El tiempo utilizado para esta prueba fue de 24 a 36 h. Esta técnica tiene el inconveniente además del tiempo, un alto costo para su realización; por lo tanto es difícil su uso en la práctica clínica habitual.

En 1944 Humphey describió el uso del Buffy coat (extendido leucocitario) para el diagnóstico de bacteriemia a través de la tinción de Gram antes de que hubiera desarrollo bacteriano en el hemocultivo; posteriormente el uso del extendido leucocitario se aplicó al diagnóstico de infección sistémica por *Candida* sp., en 1985 Ascuito y col.(26) estudiaron muestras de sangre

obtenidas de catéteres intravasculares de tres pacientes neonatos con sospecha de candidemia reportando la presencia de levaduras en el extendido leucocitario por tinción de Gram, ofreciendo una terapia antifúngica temprana a este grupo de pacientes.

Se han desarrollado pruebas rápidas utilizando Buffy coat para el diagnóstico de candidemia. En 1995 Díaz Ponce y col. (27) en un modelo animal de candidiasis inducida probó una técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en Buffy coat, utilizó como estándar de oro la necropsia y obtuvo una sensibilidad y especificidad de 60 y 100% respectivamente.

Se han empleado técnicas de tinción que permiten la visualización de formas fúngicas en cortes de tejidos embebidas en parafina, las técnicas más empleadas fueron Hematoxilina-Eosina (HE), PAS, Metenamina Silver de Gomori (MSG). Dado que estas técnicas ofrecen poca nitidez en la visualización de formas fúngicas en 1984 Jacqueline y col (28), utilizaron Blanco de Calcofluor demostrando ser un método más rápido en la lectura de tejidos infectados con *Candida sp.* con una sensibilidad de 96% y especificidad 100% comparada con la tinción de MSG; además el tiempo de lectura fue menor siendo de 60 seg. y 45 min. respectivamente.

El Blanco de Calcofluor es un colorante luminoso utilizado en la industria textil y papelera, tiene afinidad por la quitina y los polisacáridos β 1-3, β 1-4 de la pared de los hongos, el compuesto fluoresce al ser excitado con filtros

de 380-425 nm, en microscopios de fluorescencia. En 1996 Reddy TC y col (29) utilizaron fluorescencia directa (FD) con blanco de calcofluor en extendido leucocitario de pacientes neonatos con factores de riesgo para candidosis invasiva o sistémica, reportando una sensibilidad de 61.5% y especificidad de 100% utilizando como estándar de oro al hemocultivo.

En 1998 en el HP CMNSXXI (30), se compararon dos técnicas de fluorescencia: IFI contra la FD para el diagnóstico de candidemia, se encontró una sensibilidad de 60 y 90% y una especificidad de 86 y 80% respectivamente. Este estudio fue evaluado mediante una prueba diagnóstica en fase IV, demostrando ser mejor la técnica de FD para el diagnóstico de candidemia, con las ventajas de obtener resultados en un tiempo no mayor a 30 minutos, un costo inferior a todas las pruebas diagnósticas previamente mencionadas, no requiere el manejo de anticuerpos, y demostró una sensibilidad superior al hemocultivo.

El objetivo del presente estudio es evaluar el desempeño de la fluorescencia directa para el diagnóstico de candidemia en la práctica clínica habitual mediante un estudio de fase V.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN

La candidemia es una enfermedad cuyas manifestaciones clínicas son inespecíficas, su diagnóstico es un reto para el clínico; tiene una elevada mortalidad y su frecuencia ha incrementado durante las últimas décadas. Afecta principalmente a población de alto riesgo y pacientes con compromiso del sistema inmune dificultando aún más su diagnóstico. Existen pruebas serológicas para la detección de anticuerpos y antígenos fúngicos con resultados muy variables debido a la mala respuesta del sistema inmune y a la frecuencia de colonización por *Candida* spp. que presentan estos pacientes. La PCR es una prueba diagnóstica de elevada sensibilidad, pero su utilidad en la clínica es limitada. El hemocultivo continúa siendo la prueba diagnóstica más utilizada en el área clínica pero se requiere de al menos 24 h para obtener resultados y tiene una sensibilidad baja, en promedio del 30%. Por todo lo anterior se requieren de pruebas diagnósticas rápidas que permitan al clínico un diagnóstico oportuno, ofrecer un tratamiento adecuado y eficaz en los pacientes involucrados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Candida sp. ocupa el 4° lugar en aislamientos microbiológicos en hemocultivos tomados en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI durante la última década. Para su diagnóstico se han implementado pruebas como el uso de fluorescencia directa (FD) en Buffy Coat, que es una prueba rápida y requiere un tiempo menor a 3 h para el diagnóstico de pacientes con sospecha de candidemia. Esta prueba rápida ha sido comparada con una prueba de inmunofluorescencia indirecta también en extendido leucocitario en la cual la FD mostró un mejor desempeño reportando una sensibilidad del 90% y una especificidad del 80%, un valor predictivo positivo del 35% y un valor predictivo negativo del 99%, los valores para la inmunofluorescencia indirecta fueron sensibilidad 60%, especificidad 86%, valor predictivo positivo 33% y valor predictivo negativo 95%.

Por lo anterior surge la siguiente interrogante ¿Será similar la utilidad de la FD en extendido leucocitario efectuada como prueba de rutina para el diagnóstico de candidemia?

OBJETIVO

Evaluar la prueba de Fluorescencia Directa (FD) con blanco de calcofluor en extendido leucocitario (*Buffy Coat*) para el diagnóstico de candidemia en pacientes pediátricos en la práctica clínica habitual.

HIPOTESIS

En la fase V la FD tendrá una sensibilidad de 85% y especificidad de 75% en la aplicación como prueba diagnóstica de pacientes con candidemia en la practica clínica habitual.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, Tercer nivel de atención, con cobertura a la Región Suroeste del País y diversos hospitales de Zona del Distrito Federal. Servicio de Infectología Pediátrica y Laboratorio Clínico de Microbiología. Con la colección de muestras del mes de marzo 2000 a febrero 2001. Las muestras fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron todas las muestras de sangre que fueron enviadas al laboratorio clínico del Hospital de Pediatría CMNS XXI de pacientes con edades comprendidas desde recién nacidos hasta 16 años con sospecha de candidemia y que simultáneamente se hayan enviado muestras para hemocultivos.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Muestras de pacientes a los que no fue tomado en forma simultánea al menos un hemocultivo
2. Muestras inadecuadas (insuficiente, coagulada).

DISEÑO

Estudio de prueba diagnóstica en Fase V.

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

Las muestras de sangre que cumplieron los requisitos fueron procesadas para la prueba de Buffy Coat colocando 1 ml en tubo de Wintrobe, se centrifugó a 4000 r.p.m. por 7 minutos. Con una pipeta Pasteur se extrajo el suero, se tomó la capa leucocitaria colocándose en un portaobjetos y se procedió a fijar al calor, en los casos en que no se encontró capa leucocitaria se obtuvo la interfase entre el suero y el paquete globular.

Una vez fijadas, las laminillas se procesaron de la siguiente forma:

- **Fluorescencia Directa:** A la laminilla se le agregó una gota de reactivo de Blanco de Calcofluor (blanco de Calcofluor 0.05 g + Azul de Evans 0.02 g + Agua destilada 50 ml), se colocó un cubre objetos y se observó en el microscopio de Fluorescencia "Nikon", con filtro Epi-FI V2 con el objetivo 40x. La lectura se realizó de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo en todo el extendido leucocitario.

Se realizaron controles positivos y negativos para cada método cada vez que se realizó el procedimiento, los extendidos fueron valorados por tres médicos residentes (área de Infectología) en forma independiente, se catalogaron como:

a) **POSITIVA:** Cuando se observó una imagen morfológica o más por en todo el extendido leucocitario compatible con levaduras o pseudomicelios las cuales fueran intensamente fluorescentes.

b) **NEGATIVA:** No se observaron levaduras o pseudomicelios, pudiéndose observar solamente fluorescencia inespecífica.

Las muestras para hemocultivos se inocularon directamente en tubos de microhemocultivo (31) ó caldo de cultivo del sistema BacT/Alert, realizándose una siembra a las 24 h en gelosa Chocolate e incubándose a 37° C. Cuando se apreció turbidez en el tubo de microhemocultivo o detectado como positivo en el sistema Bac T/Alert; se procedió a sembrar en gelosa sangre, gelosa chocolate y Mc Conkey. Cuando no hubo cambios en ninguno de los sistemas, se realizó una resiembra al décimo día en gelosa chocolate para eliminarse definitivamente.

Se consideró como hemocultivo **positivo** cuando hubo desarrollo de *Candida* sp. y se consideró **negativo** cuando no se logró el crecimiento de levaduras o hubo desarrollo de otras bacterias; esta prueba fue considerada como estándar de oro.

Debido a la baja sensibilidad del hemocultivo para detectar candidemia (10-43%), se utilizó el criterio propuesto por Díaz Ponce y col (27) si el paciente tenía tres o más de los siguientes factores de riesgo:

- 1) Tratamiento prolongado con antibióticos de amplio espectro
- 2) Presencia de catéter intravascular por más de tres días
- 3) Neutropenia menor de 500 neutrófilos absolutos/ml y fiebre ≥ 5 días de evolución

- 4) Enfermedades oncológicas en tratamiento con quimioterapia
- 5) Nutrición parenteral total
- 6) Prematurez en caso de recién nacidos;

Que ameritaron inicio de tratamiento empírico con Anfotericina B obteniendo respuesta terapéutica al tratamiento antifúngico. Así como aquellos pacientes con aislamiento de *Candida* spp. en líquidos habitualmente estériles como: Líquido cefalorraquídeo, pleural y peritoneal, se consideraron como verdaderos positivos.

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un análisis de prueba diagnóstica con cálculo de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y eficacia global; razones de verosimilitud e intervalos de confianza a 95%.

RESULTADOS

Durante el periodo del estudio de marzo del 2000 a febrero del 2001, se procesaron un total de 252 muestras para Buffy coat de 240 pacientes hospitalizados que tuvieron sospecha de candidemia; de las cuales 101 fueron eliminados ya que no contaban con hemocultivo en forma simultánea, 151 fueron incluidos en el análisis; 48 pacientes fueron del servicio de UCIN (37.7%), 13 pacientes del servicio de lactantes (8.6%), 28 pacientes de UTIP (18.5%), 23 del servicio de pre-escolares (15.2%) y finalmente 39 del servicio de escolares (25.8%). Los diagnósticos más frecuentes fueron: neutropenia y fiebre secundario a quimioterapia en pacientes con cáncer, sepsis y neumonía.

Fluorescencia directa: La prueba de Buffy coat fue positiva en 21 casos, 6 pruebas concordaron con hemocultivos positivos; en 3 casos el hemocultivo fue positivo pero la prueba de FD fue negativa (falsos negativos). 15 pruebas de Buffy coat fueron positivas con hemocultivos negativos; el resto de las muestras procesadas (127) fueron reportadas como negativas concordando con el reporte de hemocultivos negativos. La sensibilidad fue de 66%, especificidad de 89%, valor predictivo positivo (VPP) de 28%, valor predictivo negativo (VPN) de 97% y exactitud de 88%. La razón de verosimilitud para la sensibilidad fue de 6% y para la especificidad de 0.34% con una prevalencia de 5.9% (Tabla 1).

Tabla 1.

Valores diagnósticos para la prueba de Fluorescencia Directa.

Prueba	Fluorescencia directa		
	%	IC 95%*	RV**
Sensibilidad	66	34-98	6
Especificidad	89	83-95	0.38
VPP	28	11-45	NC***
VPN	97	92-100	NC***
Exactitud	88	91-99	NC***
Prevalencia	5.9		

* Intervalo de confianza al 95%

** Razones de Verosimilitud

*** No calculado

De las 15 muestras de Buffy coat positivos con hemocultivos negativos, 10 pacientes tuvieron al menos tres factores de riesgo mencionados y además respuesta clínica al tratamiento con anfotericina B; por lo que al ser incluidos en la tabla de 2x2 dentro de los verdaderos positivos se obtuvieron los siguientes resultados: sensibilidad de 84%, especificidad 96% VPP 76%, VPN 97% exactitud de 95%, razón de verosimilitud para sensibilidad de 21% y para especificidad de 0.16% con una prevalencia de 12.5% (Tabla 2).

Tabla 2

Valores de prueba diagnóstica de fluorescencia directa.

Prueba	Fluorescencia directa		
	%	IC 95%*	RV**
Sensibilidad	84	68-100	21
Especificidad	96	93-99	0,16
VPP	76	58-94	NC***
VPN	97	94-100	NC***
Exactitud	95	91-99	NC***
Prevalencia	12,5		

* Intervalo de confianza al 95%

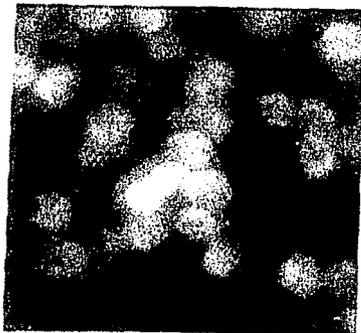
** Razones de Verosimilitud

*** No calculado

El diagnóstico de candidemia se confirmó por cultivo en 9 pacientes, 8 en hemocultivo y uno en líquido pleural. Las especies identificadas en los hemocultivos fueron *C. albicans* (6), *C. parapsilosis* (1), y *C. lusitanae* (1), *C. tropicalis* se aisló de líquido pleural.

Prueba de Buffy coat en una muestra clínica:

La imagen ovalada fluorescente en el centro corresponde a una levadura de *Candida* spp., en la periferia células sanguíneas con fluorescencia inespecífica.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS

DISCUSIÓN

El diagnóstico clínico de la candidiasis invasiva es difícil debido a que las manifestaciones clínicas son inespecíficas; los métodos microbiológicos convencionales usualmente tienen baja sensibilidad y especificidad. El hemocultivo que ha sido el método más empleado en forma rutinaria reporta una sensibilidad del 10 al 43% (13). Existen pruebas cuya sensibilidad llega a ser hasta del 100% como es el caso de la PCR (21-24) pero con la desventaja de ser un método costoso, poco accesible en los laboratorios clínicos. Lo anterior ha condicionado que se necesiten evaluar otras pruebas rápidas que permitan un diagnóstico oportuno y ofrezcan un tratamiento eficaz en el caso de pacientes con candidemia. En nuestro hospital se han implementado pruebas rápidas como la inmunofluorescencia indirecta la cual tiene una sensibilidad del 60% (27). La inmunofluorescencia directa como parte del protocolo de estudio del paciente con sospecha de candidemia sugirió ser una mejor prueba con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 80% (30).

En este estudio de las 151 muestras incluidas, solo 6 concordaron con el hemocultivo positivo y/o aislamiento en otros líquidos corporales normalmente estériles, considerando este análisis la sensibilidad fue inferior (66%) a lo reportado en el estudio de prueba diagnóstica de fase IV (90%), sin embargo, posterior a la validación del constructo clínico la

sensibilidad de la prueba diagnóstica tuvo un valor del 84% y un incremento en la especificidad a 96%.

Generalmente todas las pruebas diagnósticas de reciente aplicación, en las que depende la destreza y habilidad del que las realiza reportan valores de sensibilidad y especificidad elevados: la sensibilidad en la evaluación inicial de nuestro estudio tiene una diferencia de 24% con lo reportado en el estudio previo (66% vs 90%), por lo que se podría cuestionar si la prueba deba ser efectuada rutinariamente por el personal del laboratorio; pero al validar el constructo clínico, se demuestra la capacidad de la prueba diagnóstica.

Es posible que su eficacia se incremente al seleccionar de manera adecuada el tipo de pacientes a los que se decide tomar la prueba para el diagnóstico de candidemia, principalmente aquellos que tengan factores de riesgo y en los cuales la prueba resulte positiva con hemocultivos negativos, donde el clínico debe tomar la decisión terapéutica de manejo antifúngico. Esta prueba también puede permitir a personal inexperto (en formación) usar de manera mas adecuada los medicamentos comúnmente empleados. Es importante recalcar que esta prueba no sustituye a los criterios clínicos y aun al hemocultivo en el diagnóstico de certeza del paciente con sospecha de candidemia.

Por otro lado, además del corto tiempo en que se obtienen resultados con esta prueba (no más de 30 minutos); tomando en cuenta el material utilizado el costo de la prueba es menor al del hemocultivo (\$ 6.00 vs \$ 210.00).

El diagnóstico de candidiasis diseminada probablemente solo podrá llevarse a cabo mediante la suma de resultados de distintas pruebas; por lo que es importante continuar la evaluación de esta prueba diagnóstica en la practica clínica habitual como un método rutinario en el protocolo de estudio del paciente con alta sospecha candidiasis diseminada y que en el ejercicio clínico mantenga los valores encontrados en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

- La prueba de Buffy coat es una prueba diagnóstica rápida, poco costosa, auxiliar en el diagnóstico temprano de Candidemia en pacientes con factores de riesgo.
- La sensibilidad y especificidad de la prueba en la práctica clínica habitual supera al hemocultivo; pero aun es necesario efectuar supervisiones periódicas por expertos, incluyendo siempre controles positivos y negativos para mantener su eficiencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kumate J, Muñoz HO, Gutierrez G, Santos JI. *Candidiasis. Manual de Infectología Clínica*. 5a Edición México DF, Méndez Editores 1998; pp. 80-9.
2. Wingard RJ. Importance of candida species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 115-25.
3. MacDonald L, Baker C, and Chenoweth C. Risk factors for candidemia in a children's hospital, *Clin Infect Dis* 1998; 26: 642-45.
4. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, et al. The Epidemiology of hematogenous *candidiasis* caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1122-8.
5. Vazquez JA, Sánchez V, Dmuchowski, et al. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: An epidemiologic study. *JID* 1993; 168:195-201.
6. Pérez M. Hemocultivos: Experiencia del Hospital Infantil de México (1990-1991). *Enf Infec y Microbiol* 1992; 12:188-191.
7. Unidad de investigación de Epidemiología hospitalaria. Registro de infecciones nosocomiales. Hospital de Pediatría CMNSXXI.
8. Warnock DW. Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41, suppl D 95-105.

9. Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, et al. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of causative strains. Clin Infect Dis 1996; 23: 506-14.
10. Frasser VJ, Jones M, Dunkel J, et al. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors and predictors of mortality. Clin Infect Dis 1992; 15: 414-21.
11. Baley JE, Kliegman RM, Fanaroff AA, Disseminated fungal infections in very low-birth-weight infants: clinical manifestations and epidemiology. Pediatrics 1984; 73: 144-52.
12. Baley JE, Kliegman RM, and Fanaroff AA. Disseminated fungal infections in very low-birth-weight infants: therapeutic toxicity. Pediatrics 1984; 73:153-57.
13. Berenguer J, Buck M, Witebsky F, et al. 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.
14. García-Ruíz JC, Arilla MC, Regúlez P, et al. 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): 3284-87.

15. Corrado G, Pietro M, Flavia B and Cassone A. Assesment 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.
16. Lehatonen L, Antilla VJ, Ruutu T, et al. Diagnosis of disseminated candidiasis by measurement of urine D-arabinitol/ L-arabinitol ratio. *J Clin Microbiol* 1996; 34(9): 2175-9.
17. Christensson B, Wiebe T, Pherson C, et al. 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.
18. Hossain MA, Miyazaky T, Mitsutake H, et al. Comparison between Wako-WB003 and fungitec G test for detection of (1-->3)-beta-D-glucan in systemic mycosis. *Clin Lab Anal* 1997; 11(2):73-7.
19. Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, et al. Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 1996; 34(8): 918-21.
20. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Plasma (1-->3)beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol* 1995 33(12): 3115-8.

21. Einsele H, Hebar H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1353-60.
22. Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, et al. Serum is more suitable than whole blood diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 925-30.
23. Holmes Ar, Cannon RD, Shepher MG, et al. Detection of *Candida albicans* and other yeast in blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32(1): 228-231.
24. Shin JH, Nolte FS, and Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1454-59.
25. Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, et al. PCR-Restriction enzyme analysis for detection of DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (6): 1871-75.
26. Ascutto R, Gerber MA, Cates KL, et al. Buffy coat smears of blood drawn central venous catheters as an aid rapid diagnosis of systemic fungal infections. *J Pediat* 1985; 106 (3): 445-47.
27. Díaz-Ponce H, Solorzano-Santos F, Ruiz-Rodriguez A, et al Indirect immunofluorescent assay (IFA) in Buffy Coat as a rapid diagnostic test for invasive candidiasis. *Arch Med Res* 1995; 26 (sup 541-46).

28. Hageage G, Harrington BJ. Use of Calcofluor white in clinical mycology. *Lab Med* 1984; 15(2): 109-112.
29. Reddy TC, Chakrabarti A, Sing M, et al. Role of Buffy coat examination in the diagnosis of neonatal candidemia. *Pediat Infect Dis J* 1996; 15(8): 718-720.
30. Flores-Ruiz EM. Estudio comparativo de fluorescencia directa con blanco de calcofluor vs inmunofluorescencia indirecta en Buffy coat para el diagnóstico de candidemia en pacientes pediátricos. Tesis especialidad en Infectología Pediátrica, Hospital de Pediatría CMN S XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, UNAM. 1999.
31. Solórzano SF, Miranda NMG, Leños MB, et al. A blood micro-culture system for the diagnosis of bacteremia in pediatric patients. *Scand J Infect Dis* 1998; 30, pp. 481-483.