



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**UMAE HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA CLÍNICA

**"FRECUENCIA DE MICOSIS OPORTUNISTAS INVASIVAS EN PACIENTES
INMUNOSUPRIMIDOS CON FIEBRE DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA DEL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI, IMSS"**

PRESENTA:

DR. CHRISTIAN CUMPLIDO URIBE
MÉDICO RESIDENTE DE TERCER AÑO DE LA ESPECIALIDAD DE PATOLOGÍA CLÍNICA
U.M.A.E. HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA
CMN SIGLO XXI, IMSS

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA

DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS JAVIER MÉNDEZ TOVAR
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN DERMATOLOGÍA Y MICOLOGÍA MÉDICA
U.M.A.E. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPÚLVEDA"
CMN SIGLO XXI, IMSS



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

HOJA DE FIRMAS

**"FRECUENCIA DE MICOSIS OPORTUNISTAS INVASIVAS EN PACIENTES
INMUNOSUPRIMIDOS CON FIEBRE DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA DEL HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI, IMSS"**

Dr. Ricardo JÁUREGUI AGUILAR

Director General

U.M.A.E. Hospital de Cardiología, CMN Siglo XXI, IMSS

Dr. Jesús Salvador VALENCIA SÁNCHEZ

Director de Educación e Investigación en Salud

U.M.A.E. Hospital de Cardiología, CMN SXXI, IMSS

Dra. Noemí Patricia CASTILLO TORRES

Profesor Titular del Curso de Postgrado de la Especialidad de Patología Clínica

U.M.A.E. Hospital de Cardiología, CMN SXXI, IMSS

Dr. Luis Javier MÉNDEZ TOVAR

Director de Tesis

Laboratorio de Investigación Médica en Dermatología y Micología

U.M.A.E. Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda"

CMN SXXI, IMSS

AGRADECIMIENTOS

- Laboratorios Bio-Rad® México, por haber proporcionado gratuitamente los kits para todos los estudios inmunológicos de las micosis estudiadas.
- M. en C. Jesús Ramos, por haber apoyado amablemente a la recolección y procesamiento de muestras biológicas.
- Personal del Laboratorio Central del Hospital de Especialidades, por su cooperación y apoyo para realizar este protocolo.
- A los médicos de los servicios de Hematología, Medicina Interna, Unidad de Transplante Renal y Reumatología por su interés y cooperación.

DEDICATORIAS

- A mis padres, por su dedicación, paciencia y enseñanza de vida.
- A mi hija Lizette, por ser mi motivación y objetivo principal de cada día.
- A Elena, por permitirme hacer de esta meta un triunfo compartido: un éxito de los dos.
- Dr. Luis Javier Méndez Tovar, por su atención y alta enseñanza académica, pero sobre todo por su invaluable amistad.
- A los amigos que con una palabra de apoyo o un abrazo, sanaron los pasajes más duros de estos años.

ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EIA	Inmunoensayo enzimático
EORTC/MSG	European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group y el National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group
FOD	Fiebre de origen desconocido
GXM	Glucuronoxilomanano
HAART	Terapia antirretroviral de alta actividad
HE CMN SXXI	Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI
LBA	Lavado bronquio-alveolar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TMO	Transplante de médula ósea
UMAE	Unidad Médica de Alta Especialidad
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE DE CUADROS E IMÁGENES

CUADROS

Cuadro 1	5
Cuadro 2	6
Cuadro 3	7
Cuadro 4	8
Cuadro 5	9
Cuadro 6	9
Cuadro 7	45
Cuadro 8	47
Cuadro 9	48
Cuadro 10	48

IMÁGENES

Imagen 1	10
Imagen 2	13
Imagen 3	16
Imagen 4	19
Imagen 5	33
Imagen 6	35
Imagen 7	38
Imagen 8	39
Imagen 9	42
Imagen 10	43
Imagen 11	44
Imagen 12	44
Imagen 13	45
Imagen 14	46
Imagen 15	49

Imagen 16	49
Imagen 17	50
Imagen 18	50
Imagen 19	51
Imagen 20	51
Imagen 21	51

CONTENIDO

HOJA DE FIRMAS.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS E IMÁGENES	vi
CONTENIDO	viii
ÍNDICE.....	ix

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. <i>CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS</i>	5
2.1.1. Micosis superficiales.....	5
2.1.2. Micosis subcutáneas.....	6
2.1.3. Micosis sistémicas	7
2.1.4. Micosis oportunistas invasivas	8
2.2. <i>FIEBRE DE ORIGEN DESCONOCIDO</i>	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	25
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
7.1. <i>UNIVERSO DE TRABAJO</i>	26
7.1.1. Criterios de inclusión	26
7.1.2. Criterios de exclusión	27
7.2. <i>PROCEDIMIENTOS</i>	27
7.2.1. Especímenes	28
7.2.2. Visualización, cultivo e identificación de hongos	30
7.2.3. Serología y estudio de otros líquidos biológicos	32
7.2.4. Equipos utilizados.....	40
7.2.5. Instalaciones	40
7.3. <i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	41
8. RESULTADOS.....	42
8.1. <i>DISTRIBUCIÓN POR EDAD Y GÉNERO</i>	42
8.2. <i>TIPOS DE FIEBRE DE ORIGEN DESCONOCIDO</i>	43
8.3. <i>PREVALENCIA DE MICOSIS OPORTUNISTAS INVASIVAS EN PACIENTES CON FOD</i>	43
8.4. <i>ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA Y FACTORES PREDISONENTES</i>	46
8.5. <i>DESEMPEÑO DE EQUIPOS INMUNOLÓGICOS</i>	47

8.6. <i>CONCORDANCIA ENTRE ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS</i>	48
8.7. <i>IMÁGENES OBTENIDAS</i>	49
9. DISCUSIÓN	52
10. CONCLUSIONES.....	56
11. ANEXOS.....	57
12. BIBLIOGRAFÍA	59

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

Las micosis oportunistas invasivas son aquellas que se presentan fundamentalmente en hospederos inmunosuprimidos con disfunción de varios de los mecanismos de defensa. Estas, han aumentado considerablemente en los últimos años debido a varios factores como el aumento gradual en los factores de oportunismo como la inmunosupresión favorecida por cirugías, trasplantes, citostáticos, diabetes, obesidad y la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). En el Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI (HE CMN SXXI), se atienden gran número de pacientes que desarrollan Fiebre de Origen Desconocido (FOD), pero como ocurre en el resto del país, se ignora la importancia de las micosis en la etiología de este síndrome.

JUSTIFICACIÓN:

Actualmente, no existen datos formales sobre la FOD asociada a micosis invasivas en la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAЕ), Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, y suponemos que son sub-diagnosticadas, debido a que el diagnóstico se realiza en base a la observación y aislamiento de los agentes, procedimientos que en muchas ocasiones no es posible realizar en estos pacientes, actualmente en el diagnóstico tampoco se incluyen pruebas serológicas de alta especificidad y sensibilidad.

OBJETIVOS:

Objetivo General

- Conocer la prevalencia de las infecciones micóticas invasivas como causa de fiebre de origen desconocido en pacientes inmunosuprimidos del HE CMN SXXI.

Objetivos Específicos

- Conocer la prevalencia de candidosis, aspergilosis, criptococosis y neumocistosis en pacientes inmunosuprimidos con FOD.
- Establecer concordancia entre los estudios de visualización y aislamiento de hongos en pacientes con FOD y las pruebas de detección inmunológicas que se emplearán en ésta investigación, con el fin de determinar el desempeño de los estudios inmunológicos como auxiliares diagnósticos.

HIPÓTESIS:

La principal causa de FOD en el HE CMN SXXI será *Candida spp.* y otras infecciones fúngicas como aspergilosis y criptococosis, tendrán menos frecuencia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio se realizó en especímenes de pacientes inmunosuprimidos con FOD de diversos servicios. Al material obtenido, se le realizaron estudios de detección microscópica, aislamiento y pruebas inmunológicas con el fin de detectar la presencia de hongos o antígenos de los agentes causantes de candidosis, aspergilosis, criptococosis y neumocistosis. Además se estableció la concordancia entre las técnicas empleadas.

El estudio se llevó a cabo en el Hospital de Especialidades, en las siguientes áreas: Laboratorio de Investigación Médica en Dermatología y Micología; Laboratorio Central y Unidad de Investigación Biomédica de Inmunobioquímica. Los materiales y equipos fueron de las mismas áreas y los kits para los estudios inmunológicos fueron una donación de Laboratorios BIO-RAD®.

RESULTADOS:

Se ingresaron 34 pacientes al protocolo de estudio en las distintas subclasificaciones de FOD. En total, se obtuvieron 104 especímenes diversos para el estudio de los pacientes, de los cuales 70 se cultivaron y 28 fueron positivos (40%). De 14 aislamientos de hongos, 42.86% fueron de hongos filamentosos del género *Aspergillus* y el 57.14% restante fueron levaduras.

La prevalencia de las micosis invasivas fue de 35.29% ($n=12$). De los 12 pacientes con micosis invasivas, 50% ($n=6$) fueron candidosis, 16.67% ($n=2$) fueron criptococosis y hubo 4 aspergilosis (33.33%).

Platelia™ *Aspergillus* EIA presentó una sensibilidad y especificidad de 75% y 100% respectivamente; Pastorex™ *Crypto* Plus tuvo una sensibilidad del 100% y especificidad del 96.87%; Pastorex™ *Candida* presentó un rendimiento de 0.0% de sensibilidad; a MonoFluo™ *P. jirovecii* no se evaluó el desempeño, debido a que no se obtuvieron resultados positivos en los métodos estándar ni en el método inmunológico.

CONCLUSIONES:

Las micosis oportunistas invasivas en la UMAE, HE CMN SXXI, son una causa importante de morbi-mortalidad en los pacientes con enfermedades y/o tratamientos inmunosupresores. Las infecciones causadas por el género *Candida* fueron las más frecuentes. La aspergilosis ocupó el segundo lugar de frecuencia con una mortalidad de 25%. Finalmente, el género *Cryptococcus* representa la tercera causa de las micosis invasivas.

El uso de métodos inmunológicos, en la mayoría de los casos, podría ser de utilidad para hacer el diagnóstico oportuno de las micosis invasivas oportunistas, principalmente para el estudio de pacientes con criptococosis y aspergilosis.

Por la alta prevalencia de las micosis invasivas, los laboratorios de las Unidades Médicas de Alta Especialidad del CMN Siglo XXI, deben tener en su carta de servicios, pruebas con alta sensibilidad y especificidad para la búsqueda de micosis invasivas y personal altamente capacitado para la identificación de agentes micóticos.

2. INTRODUCCIÓN

MICOLOGÍA: del griego *mykes*, *myketos*: hongo; *logos*: estudio, tratado. Ciencia que trata del estudio de los hongos.

El primer registro de infección fúngica se describe en el *Atharva Veda*, libro sagrado de los hindúes (2000-1000 a.C.), en referencia al micetoma del pie. Entre los griegos, Hipócrates (460-370 a.C.) describe el algodoncillo bucal (candidosis bucal), y entre los romanos, Aulus Cornelius Celsus (14 d.C.) describe la tiña inflamatoria, candidosis oral y favus.

Hasta la fecha la tiña inflamatoria del pelo se le llama “kerion de Celso” en su honor. El padre de la Micología, Pietro Antonio Micheli (1679-1737), publica en 1729, *Nova Plantarum Genera*, donde describe 900 hongos diferentes, y es el primero en probar que los hongos producen esporas, germinan, y dan origen a colonias fúngicas. Agostino Bassi (1773-1856) de Lombardía, es considerado el padre de la Micología Médica, por descubrir la naturaleza fúngica (*Beauveria bassiana*) de una enfermedad en el gusano de seda (*Bombyx mori*) [1].

La frecuencia de las micosis en México ha aumentado considerablemente en los últimos años, debido a varios factores como el aumento de inmunosupresión favorecida por cirugías, trasplantes, drogadicción, citostáticos, diabetes, obesidad, aumento en la esperanza de vida, antiinflamatorios esteroideos y la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [2]. Otro factor que se pudiera incluir al número de coadyuvantes para la presentación de las micosis, es la marginación económica y social, ya que en un estudio realizado en los años 2004 y 2005 en cinco comunidades con extrema pobreza del territorio mexicano, se realizaron consultas dermatológicas, encontrando que 9 a 20% de las afectaciones son de etiología micótica [3].

2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS

A lo largo de la historia las infecciones micóticas se han clasificado de diversas maneras, por ejemplo: en superficiales y profundas; por patógenos primarios o por hongos oportunistas. En esta revisión, utilizaremos la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud, que las divide en superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas. Aunque debemos decir que algunas micosis oportunistas también son primariamente patógenas, por contar con factores de virulencia que les permiten invadir los tejidos [1]. A continuación, se presentan los diferentes grupos de micosis en cuadros sinópticos.

2.1.1. Micosis superficiales

Cuadro 1. Se presentan las micosis superficiales más frecuentes y los géneros de sus agentes etiológicos.

MICOSIS SUPERFICIALES				
	AGENTES	PRESENTACIÓN CLÍNICA	INFECCIÓN	EVOLUCIÓN
PIEDRAS	<i>Trichosporon</i> spp. <i>Piedraia</i> spp.	Piedra blanca Piedra negra	Contacto directo	Benigna, tienden a la cronicidad
DERMATOFITOSIS	<i>Trichophyton</i> spp. <i>Microsporum</i> spp. <i>Epidermophyton</i> spp.	Tiñas (capitis, corporis, pedis, etc.) Onicomycosis		
ENFERMEDADES POR <i>Malassezia</i>	<i>Malassezia</i> spp.	Dermatitis seborreica Pitiriasis versicolor Foliculitis		
TIÑA NEGRA	<i>Hortaea werneckii</i>	Tiña negra		

2.1.2. Micosis subcutáneas

Cuadro 2. Se presentan las micosis subcutáneas, sus agentes etiológicos y sus vías de ingreso más frecuentes.

MICOSIS SUBCUTÁNEAS					
	AGENTES	PRESENTACIÓN CLÍNICA	INFECCIÓN	EVOLUCIÓN	POBLACIÓN EN RIESGO
ESPOROTRICOSIS	<i>Sporothrix schenckii</i> <i>S. mexicana</i> <i>S. globosa</i>	Esporotricosis fija, linfagítica, sistémica, pulmonar	Solución de continuidad	Benigno Crónico Discapacitante Sistémica en algunas ocasiones	Personas con nivel socio-económico bajo,
CROMOBLASTOMICOSIS	<i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Clamidosporium carrionii</i> <i>Phialophora verrucosa</i> <i>Exophiala</i> spp.	Cromoblastomicosis (principalmente en extremidades inferiores)	Solución de continuidad	Benigno Crónico Discapacitante	campesinos, jardineros, leñadores, personas con estados de
EUMICETOMA	<i>Acremonium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Curvularia</i> spp. <i>Exophiala</i> spp. <i>Madurella</i> spp. <i>Phialophora parasitica</i>	Micetoma, pie de Madura (principalmente extremidades inferiores)	Solución de continuidad	Benigno Crónico Discapacitante	desnutrición avanzada, inmunosuprimidos.
LOBOMICOSIS	<i>Lacazia loboi</i>	Lobomicosis	Solución de continuidad	Benigno Discapacitante	
CONIDIOBOLOMICOSIS	<i>Conidiobolus</i> spp.	Conidiobolomicosis	y piel lacerada	Benigno Crónico Discapacitante	
BASIDIOBOLOMICOSIS	<i>Basidiobolus ranarum</i>	Basidiobolomicosis		Benigno Crónico Discapacitante	

2.1.3. Micosis sistémicas

Cuadro 3. Se presentan las micosis sistémicas, los agentes etiológicos y sus vías de ingreso más frecuentes.

MICOSIS SISTÉMICAS					
	AGENTES	PRESENTACIÓN CLÍNICA	INFECCIÓN	EVOLUCIÓN	POBLACIÓN EN RIESGO
HISTOPLASMOSIS	<i>Histoplasma capsulatum</i> y sus variedades	Histoplasmosis pulmonar, sistémica, cutánea	Vía respiratoria	Crónico, sin tratamiento evoluciona a la muerte del hospedero	Mineros, espeleólogos, ecoturistas, inmunosuprimidos
COCCIDIOIDOMICOSIS	<i>Coccidioides immitis</i> , <i>Coccidioides posadasii</i>	Coccidioidomicosis pulmonar, cutánea, invasión ganglionar, sistémica	Vía respiratoria, traumatismo		Inmunosuprimidos, personas que residen o viajan a las zonas endémicas
PARACOCCIDIOIDOMICOSIS	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Paracoccidioidomicosis pulmonar, sistémica	Vía respiratoria		Inmunosuprimidos, personas que residen o viajan a las zonas endémicas
BLASTOMICOSIS	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Blastomicosis cutánea, sistémica, osteomielitis, urosepsis, neumonía, invasión ganglionar	Vía respiratoria, traumatismo		Inmunosuprimidos, no se ha relacionado riesgo ocupacional

2.1.4. Micosis oportunistas invasivas

Las micosis oportunistas invasivas son aquellas que se presentan fundamentalmente en hospederos inmunosuprimidos con disfunción de varios de los mecanismos de defensa. En las últimas dos décadas las infecciones oportunistas de origen fúngico se han incrementado y al mismo tiempo han cambiado el espectro, en especial de las micosis invasoras. La mayoría de estas infecciones se debe a hongos de los géneros *Aspergillus* y *Candida*. Sin embargo, recientemente hongos de otros géneros como *Cryptococcus*, *Mucor* y *Pneumocystis*, están siendo aislados con una mayor frecuencia y son responsables de 37% de las infecciones micóticas en transplantados y 43% de las muertes [4].

Cuadro 4. Factores predisponentes de las micosis invasivas oportunistas según Vásquez y Arenas [4].

FACTORES PREDISPONENTES PARA MICOSIS INVASIVAS	
• Transplante de médula ósea	• Enfermedad neoplásica
• Transplante de órgano sólido	• Terapia inmunosupresora
• Cirugía mayor	• Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
• Edad avanzada	• Recién nacidos prematuros

En el año 2002, el grupo de consenso llamado “European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group” (EORTC/IFICG) y el “National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group” (MSG), publicaron definiciones estandarizadas para la investigación epidemiológica y estudio de las infecciones fúngicas invasivas. Estas definiciones clasifican, al paciente inmunosuprimido, en tres niveles distintos de probabilidad de padecer una infección fúngica invasiva como “posible”, “probable” y “demostrada” [5]. En el 2008, el mismo grupo de consenso revisó las definiciones haciendo ajustes a los criterios utilizados para clasificar a los pacientes con inmunocompromiso; estos ajustes no excluyen del todo a pacientes sin inmunosupresión evidente. Esta es la razón de más peso para no utilizar éstas definiciones como guía en la práctica clínica diaria y solo deben ser utilizadas para apoyar la investigación [6].

Cuadro 5. Características que presentan las infecciones por micosis invasivas oportunistas.

CARACTERÍSTICAS DE LAS MICOSIS INVASIVAS OPORTUNISTAS	
<ul style="list-style-type: none">• Requieren alto grado de inmunosupresión del hospedero• Alta morbilidad	<ul style="list-style-type: none">• Han incrementado su frecuencia debido a tratamientos y enfermedades inmunosupresoras• Alta mortalidad

Cuadro 6. Micosis invasivas oportunistas más frecuentes, según Vásquez y Arenas [4].

MICOSIS INVASIVAS MAS COMUNES	
<ul style="list-style-type: none">• Aspergilosis• Candidosis• Peniciliosis	<ul style="list-style-type: none">• Mucormicosis• Neumocistosis• Criptococosis

En este trabajo, nos enfocaremos sólo a las micosis invasivas oportunistas más frecuentes en centros nosocomiales grandes y que además existen métodos inmunológicos para el diagnóstico de dichas infecciones fúngicas que son: candidosis, aspergilosis, criptococosis y neumocistosis.

Candidosis

El género *Candida* está compuesto aproximadamente por 200 especies. Algunas de éstas, son dimórficas y se pueden presentar como levaduras de 2 a 4µm por 3 a 7µm (imagen 1). En el tejido parasitado se observan además de las levaduras pseudomicelio y micelio. Varias especies son comensales del cuerpo humano y residen en las mucosas, tubo digestivo, aparato respiratorio alto, piel del hombre y otros animales vertebrados, también se desarrollan en detritus y alimentos. Habitualmente, estos organismos no se encuentran en el suelo o en el aire en condiciones naturales. Su distribución es mundial [1].



Imagen 1. Microscopía de *Candida* sp., obsérvese las estructuras predominantemente levaduriformes (arriba) y la formas de pseudomicelio (abajo).

De éste género, *C. albicans* ha sido el principal patógeno. En el mundo, es responsable de 59% de las septicemias y en Latinoamérica causa 45% de estas infecciones. Se ha informado que *C. parapsilosis* puede ser aislada a partir de las manos en 19% de los trabajadores de las unidades de cuidados intensivos [6,7]. *Candida* spp. es el cuarto patógeno en frecuencia aislado a partir de hemocultivos en casos de infecciones nosocomiales de 8 a 10% y la mortalidad por candidemia se informa entre 29 y 40% [8].

La incidencia de la candidosis invasiva en mucosas de portadores del VIH, es una de las estadísticas más sobresalientes, ya que 95% de estos pacientes la llegan a presentar en algún momento de su evolución, y en muchos casos es el primer signo del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [9].

Hernández, Córdova *et al.*, estudiaron de junio de 1999 a mayo de 2000, 268 especímenes de 108 pacientes con inmunosupresión hospitalizados en el Hospital Regional General Ignacio Zaragoza, Cd. de México. Se estudiaron especímenes de origen múltiple. Se obtuvieron 168 cultivos positivos, de los cuales 103 fueron levaduras y 66 fueron hongos filamentosos. El género *Candida* fue el aislamiento más frecuente con 89.6% de los casos de micosis [10].

Estudios en todo el mundo, muestran que la distribución de agentes etiológicos en las candidosis están cambiando. Un estudio multicéntrico realizado en México, donde se estudiaron 393 pacientes hospitalizados, se obtuvieron 455 aislamientos, donde 56% fueron identificados como *Candida albicans*, 37% fueron *Candida* no-*albicans*: 47% fueron *C. tropicalis*, 13% *C. parapsilosis*, 12% *C. glabrata*, 10% *C. krusei*. El mismo grupo de estudio realizó una segunda investigación obteniendo 250 aislados de julio a noviembre del 2007; de ellos, 108 aislados correspondieron a *Candida albicans*, 43 a *C. tropicalis*, 25 a *C. glabrata*, 22 a *C. parapsilosis*, 24 a otras levaduras y el resto fueron hongos filamentosos [11].

Los métodos diagnósticos empleados en laboratorios de primer contacto para el diagnóstico de candidosis u otras micosis son la microscopía directa, las tinciones simples y compuestas y los cultivos. En los laboratorios de especialidad, además se cuenta con técnicas de fluorescencia, métodos inmunológicos y de biología molecular, todos con sensibilidad y especificidad que varían ampliamente, lo que complica la interpretación de estos estudios.

En las últimas décadas se han desarrollado pruebas de inmunoaglutinación en látex y es uno de los métodos más utilizados por su bajo costo y fácil preparación, pero en distintos estudios ha mostrado ser una prueba poco sensible [12,13]. Se estima por parte de la casa comercial Bio-Rad® (fabricante de Pastorex™ *Candida*), una especificidad de 99.7% pero una baja sensibilidad promedio de 32%.

También se han diseñado pruebas con mayor sensibilidad y especificidad por Inmunoensayo Enzimático (EIA) para candidosis, donde estudios retrospectivos han definido una sensibilidad del 80-100% [14]. Esto se debe en parte al límite de detección de antígeno que presenta el EIA (0.2ng/mL) contra el límite de detección de la aglutinación en látex (2.5ng/mL). Otros métodos incluyen la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). La PCR tiene una sensibilidad cercana al 95% comparada al 75% del EIA, según un estudio realizado por Lewis *et al.*, quienes encontraron una especificidad de 97% en ambos métodos [15]. Sin embargo, el costo de la biología molecular y los requisitos de infraestructura para desarrollar estas técnicas son demasiado altos para la mayoría de los laboratorios clínicos.

Aspergilosis

El término aspergilosis se ha utilizado para describir la enfermedad atribuida a colonización o a invasión tisular por hongos del género *Aspergillus*. Aunque las especies que componen este género son aproximadamente 180, los más frecuentes son *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*, ya que diversos estudios muestran que entre las tres especies causan aproximadamente 85% de las infecciones, el resto son debidas a *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. ustus* y otros [8].

Son hongos filamentosos que presentan hifas de 4 a 6 μ m de diámetro, con conidióforos especializados que presentan vesículas, esterigmas o fiálides de donde salen los conidios (imagen 2). La forma tisular muestra hifas separadas gruesas y en algunos casos las cabezas aspergílicas; los microconidios alcanzan un diámetro de 2.5 a 4.5 μ m. Es un organismo que puede encontrarse en el medio ambiente de todo el mundo; puede sobrevivir en los sistemas de ventilación y de aire acondicionado de las unidades hospitalarias, donde representa un riesgo importante para los pacientes inmunosuprimidos, sobrevive al efecto de los desinfectantes habituales. Puede hallarse también en el heno, entre los granos almacenados, entre la hojarasca y en el suelo [1].



Imagen 2. Cabezas aspergílicas de *Aspergillus* sp., se muestra la vesícula (flecha gruesa), las fiálides (flecha delgada) y los conidios (triángulo).

Las infecciones pueden ser superficiales como: las localizadas en piel, queratitis, sinusitis y otitis del nadador. *Aspergillus* spp., produce infección broncopulmonar, localizada y profunda con invasión intravascular y formación de trombos en los pulmones. En región rinocerebral se puede encontrar como agente infeccioso invasivo en senos paranasales, ojos, cerebro y otros órganos. *Aspergillus fumigatus* y *A. flavus*, son los agentes más comunes, seguidos por otras especies [1].

La incidencia de aspergilosis invasiva en pacientes postransplantados se ha elevado de 6-15% en sólo una década. El mayor riesgo es para los pacientes de trasplante alogénico de médula ósea, especialmente en la fase postinjerto, mientras que en el caso del trasplante autólogo, el riesgo ocurre en la fase de neutropenia [4]. En los trasplantes de órgano sólido, la mortalidad es alta con cifras que oscilan entre 63 a 100%; cuando se presenta aspergilosis invasiva, el paciente con trasplante de páncreas es el más afectado [16]. Para los pacientes con trasplante renal la incidencia de la aspergilosis es de 0.7%, presentándose comúnmente (75% de los casos) durante los primeros 3 meses postransplante, donde *A. fumigatus* y *A. flavus* representan el 90% de estas micosis. La mortalidad se estima entre 75 a 80% [16,17]. Algunos estudios reconocen una incidencia de 10 a 14% en pacientes con malignidades hematológicas y una mortalidad que oscila de 50 a 70% globalmente [18].

Debido a su alta mortalidad, el diagnóstico de la aspergilosis requiere además de los métodos básicos (examen directo, frotis, cultivo y estudio histológico), métodos altamente sensibles, específicos y con un tiempo de respuesta corto y que permitan detectar infecciones en órganos o tejidos no accesibles para toma de especímenes para visualización del agente. Además, el aislamiento y/o la visualización del hongo, es difícil y a menudo tardío. Se estima que el cultivo de Lavado Bronquio-alveolar (LBA), el estudio histológico y el cultivo histológico otorgan sensibilidades de 84.6%, 53.8% y 85.7% respectivamente en pacientes con aspergilosis probable y probada según la clasificación de la EORCT/MSG [19].

Se han realizado innumerables protocolos de estudio para evaluar el desempeño de los equipos de diagnóstico de aspergilosis por EIA, en particular, de la casa comercial Bio-Rad® (Platelia™ *Aspergillus* EIA), donde la sensibilidad y especificidad del equipo ha sido buena. Además, se ha observado una relación importante con el sitio de invasión y la sensibilidad del estudio (sensibilidad de 94-100% y especificidad de 88-92%) [20].

La casa comercial Bio-Rad® explica en su inserto, que el estudio de sensibilidad de su equipo se realizó usando la prueba de Platelia™ *Aspergillus* EIA en dos centros hospitalarios, con un número total de 38 episodios de aspergilosis en 35 pacientes trasplantados de médula ósea (TMO) y pacientes con leucemia diagnosticados con aspergilosis invasiva demostrada o probable. La especificidad se calculó en 90.5%. Actualmente la EORCT/MSG reconoce un resultado positivo de esta prueba como evidencia suficiente para considerarse la enfermedad como una aspergilosis probada [6]. Sin embargo se sabe que algunas ocasiones existen medicamentos que tienen reactividad cruzada, principalmente antibióticos del tipo β -lactámicos, particularmente piperacilina/tazobactam [21,22].

El estudio de especímenes está limitado al suero sanguíneo, según las recomendaciones del fabricante, pero últimamente se han realizado estudios para evaluar la utilidad del LBA como espécimen a estudiar. En un estudio publicado en 2008, se analizaron productos de LBA por medio del Platelia™ *Aspergillus* EIA, donde se mostró que la sensibilidad es mayor en LBA que en el suero como espécimen a estudiar. La sensibilidad fue de 88% y la especificidad de 87% en el caso del LBA; la sensibilidad en suero fue de 42% en los mismos pacientes [23]. Sin embargo la casa comercial no estandariza aún la técnica con LBA. Este equipo es aprobado para uso y comercialización en Estados Unidos por la Food and Drug Administration desde el 2006.

Por técnicas moleculares como PCR, se ha obtenido alta sensibilidad como demuestran algunos estudios, donde la sensibilidad es de 100% y la especificidad es 96.7% con PCR en Tiempo Real en suero de pacientes con micosis probada y probable con enfermedad hematológica de base [18]. Se han realizado algunos estudios de biología molecular (PCR cuantitativa), estudiando especímenes de producto de LBA, sin embargo

no se han obtenido resultados satisfactorios, principalmente en el aspecto de la sensibilidad de la prueba (76.9%) en pacientes con aspergilosis probable y probada [17]. Estas pruebas no se utilizan de rutina en los laboratorios clínicos, únicamente se han descrito para investigación, ya que su valor diagnóstico sigue en evaluación [16].

Criptococosis

Es una infección localizada o diseminada ocasionada por el género *Cryptococcus*, el cual produce una infección primaria pulmonar asintomática, posteriormente se dirige al sistema nervioso central (SNC) por un tropismo tisular característico. El género *Cryptococcus* está formado por varias especies de levaduras encapsuladas que se reproducen por gemación. La fase teleomórfica de la especie más frecuente corresponde a basidiomicetos denominados *Filobasidiella neoformans*, var. *neoformans* y var. *bacillispora*.

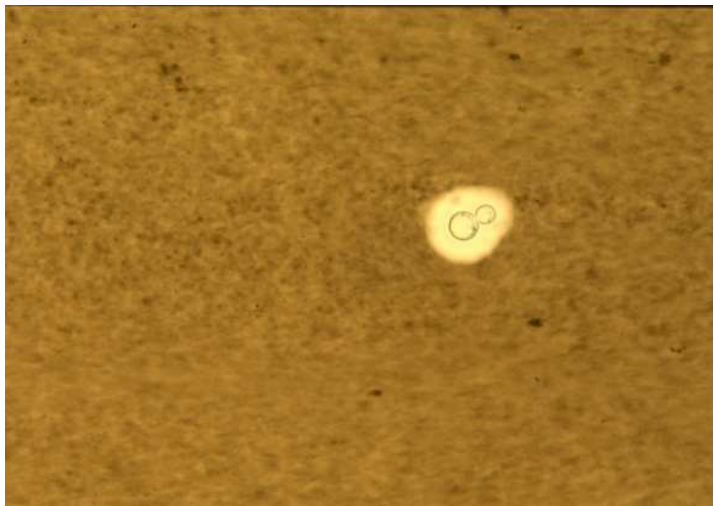


Imagen 3. Levadura gemante de *Cryptococcus* sp., observado con técnica de tinta china, obsérvese la cápsula de mucopolisacárido (halo claro).

La cápsula de estos hongos está formada por mucopolisacárido y el diámetro va de 4 a 6µm (imagen 3). Es un microorganismo ubicuo y se encuentra en las excretas de las aves, así como en la superficie de diferentes frutas y vegetales. *Cryptococcus* spp., penetra al humano por vía respiratoria, donde la infección suele ser asintomática. La cápsula incrementa la patogenicidad. El hongo no se considera como biota normal [1].

La criptococosis es una infección de distribución mundial. La infección más frecuente es la pulmonar; sin embargo, la forma más grave es la meníngea que puede asociarse con hipertensión endocraneal y muerte. En algunos pacientes puede haber diseminación hematológica a piel. En los pacientes con SIDA, *Cryptococcus* spp., infecta y persiste en próstata a pesar de tratamiento [1].

En Estados Unidos las criptococosis ocurren en una razón de 0.2-0.9 casos por cada 100,000 personas no infectadas por VIH y 1,700-6,600 casos de cada 100,000 infectados por VIH [24]. 8.5 por cada 100,000 casos se presentan en pacientes con neoplasias [25]. En la India, en un estudio de 310 receptores de trasplante renal, se describió 2.9% de incidencia de esta infección [25,26]. La infección generalmente es producida por *C. neoformans* serotipos D y particularmente A en pacientes con SIDA. En los últimos años se han relacionado infecciones también por la especie *C. gattii*. En Europa, la incidencia de la criptococosis en sistema nervioso central es de 10% en pacientes con VIH. En África, la incidencia llega a ser de 30% [9]. La presentación más común es la meníngea en pacientes con VIH y cáncer, mientras que en el paciente transplantado se presentan formas cutáneas u osteoarticulares. La supervivencia en los pacientes VIH y con cáncer varía desde 43 a 70% dependiendo la presentación clínica y estado inmunológico [25]. En México, se ha reportado específicamente en 45 pacientes con inmunocompromiso, seis casos de criptococosis en sus diferentes presentaciones clínicas, de los cuales cinco eran portadores del VIH [10].

El método diagnóstico más utilizado en el laboratorio, es la visualización de la levadura y su cápsula por medio de la tinción negativa de tinta china en líquido cefalorraquídeo, que tiene una sensibilidad del 60-80% en pacientes VIH positivos. El cultivo es también otro método utilizado, donde la levadura produce colonias grandes de aspecto mucoso en agar Sabouraud, este método tiene una sensibilidad mayor a 95% en pacientes que no hayan recibido tratamiento antifúngico.

Las técnicas inmunológicas con aglutinación de partículas de látex recubiertas de anticuerpos monoclonales antiglucuronoxilomanano (anti-GXM) son actualmente bien aceptadas. Estas partículas producen una reacción de aglutinación perceptible para el ojo humano cuando el antígeno glucuronoxilomanano (GXM) está presente en el espécimen. Este método tiene alta sensibilidad y especificidad de 93% y 97% respectivamente [27], , la técnica puede realizarse en distintos fluidos corporales (a diferencia de la tinción negativa con tinta china que se realiza casi exclusivamente en LCR) y los resultados semi-cuantitativos pueden utilizarse para monitorizar la respuesta al tratamiento. La casa comercial Bio-Rad®, refiere en su inserto que la prueba Pastorex™ *Crypto* Plus, presenta sensibilidad de 92% y especificidad de 98%.

El uso de técnicas moleculares con ácidos nucleicos como la PCR, aunque aparentemente serán las técnicas diagnósticas del futuro, actualmente sigue siendo experimental.

Neumocistosis

El género *Pneumocystis* se observó por primera vez en su forma quística en 1909. Su descubrimiento fue circunstancial en pacientes con malaria y se pensaba que los quistes de *Pneumocystis*, eran formas esquizogónicas de *Trypanosoma cruzi*, por lo que adquirió el nombre de *Schizotrypanum*. Posteriormente Chagas y Carini lo consideraron una entidad sin relación con la tripanosomiasis, y lo visualizaron como un protozooario similar a las coccidias, con tropismo importante a los tejidos pulmonares llamándolo *Pneumocystis carinii*.

La taxonomía de *Pneumocystis* ha variado conforme distintos investigadores han encontrado mayores datos que sugieren su naturaleza. Jirovec en 1964, sugirió el estudio de *Pneumocystis* por su ultra estructura y no por su ciclo vital, lo cual destruyó su relación con las coccidias. Pero no fue hasta 1970, cuando Vavra y Kucera, que sugirieron que este género presentaba características fúngicas debido a su ultraestructura.

Las técnicas de biología molecular, en las últimas décadas, se han convertido en una herramienta indispensable en la taxonomía de muchos organismos vivos, *Pneumocystis* spp., también ha sido clasificado en base a estas técnicas y a partir de 1988 se considera un hongo [28]. Los mismos estudios moleculares han demostrado que muchos mamíferos tienen una especie de *Pneumocystis* particular, de tal manera que *P. carinii* sólo lo encontramos en roedores, mientras que en humanos la única especie que se detecta y puede causar enfermedad es *P. jirovecii*.

Se conocen diversos estadios en su ciclo vital: forma trófica (2-8µm), esporozoíto temprano (3.5-4.5µm), esporozoíto intermedio (4-6µm), esporozoíto tardío (4-6µm), quiste (4-7µm), espora (1-2µm). Las formas tróficas representan 90 a 95% de la población total de los estadios cíclicos en el pulmón de un hospedero de *Pneumocystis* (imagen 4) [10,28].

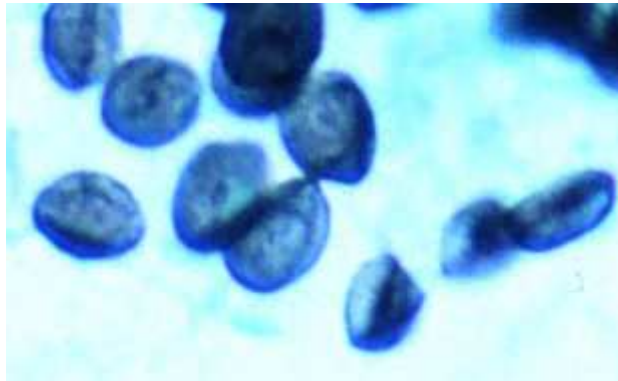


Imagen 4. Quistes y formas tróficas de *P. jirovecii* observados con tinción de metamina argéntica. Tomada de: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Pneumocystis_il.htm

No se le conoce forma de vida libre, se aísla de los alveolos pulmonares del humano y de diversos animales como ratones, ratas y cobayos; cuando se disemina la infección pulmonar, puede afectar otros órganos como médula ósea, piel, ganglios, etcétera.

Se adquiere por vía respiratoria, por inhalación de parásitos a partir de personas o animales infectados, el parásito se aloja en los bronquiolos y alveolos pulmonares, ocasionando un proceso inflamatorio con la presencia de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. El exudado protéico intraalveolar provoca una insuficiencia respiratoria con alto grado de hipoxemia que conduce en muchas ocasiones a la muerte [10].

El paciente generalmente presenta una neumonía de instalación rápida y progresiva que inicia con tos seca y rara vez productiva, taquipnea, dolor torácico, fiebre, mal estado general, pérdida de peso, cianosis y postración. La muerte sobreviene a corto plazo hasta en 85% de los pacientes si no se administra tratamiento específico y oportuno. La población en mayor riesgo son los portadores de VIH/SIDA con cuenta de células CD4+ menor a 200células/ μ L, personas de edad avanzada, pacientes con desnutrición de tercer grado y recién nacidos prematuros [10].

Antes de la década de los años 80 del siglo pasado, la neumocistosis era poco frecuente, en los años posteriores al descubrimiento del VIH, el número de casos de neumocistosis llegó hasta 20,000 por año. La incidencia de esta enfermedad comenzó a declinar cuando se consideró la profilaxis en los pacientes VIH positivos con cuenta de células CD4+ menores a 200cél/ μ L, además del uso de la terapia antirretroviral de alta actividad (HAART, por sus siglas en inglés) a partir de 1996. Sin embargo, este agente sigue siendo un riesgo importante para esta población inmunosuprimida [29].

La prevalencia del *Pneumocystis*, varía entre grupos etarios. Se han estudiado personas inmunocompetentes e inmunosuprimidos, así como a sus familias por métodos altamente sensibles para estimar la prevalencia. Se considera que el estado de seropositividad a *Pneumocystis* se adquiere en los primeros meses de vida, ya que 85% de la seroconversión es antes de los 20 meses de vida extrauterina [29,30,31]. La seroprevalencia es proporcional a la edad; 52% de la población es positiva a los 6 años de edad. a los 10 años aumenta a 66% y a los 13 años 80% de la población infantil sana presenta seropositividad para este hongo [31,32].

En autopsias realizadas en infantes fallecidos a causa de afecciones pulmonares diversas, la incidencia por colonización por *Pneumocystis* varía ampliamente, dificultando la interpretación de los resultados (método utilizado: PCR); esta incidencia oscila desde 9.4% hasta 100% de los casos. Se ha intentado relacionar con el síndrome infantil de muerte súbita, sin lograr encontrar sustentabilidad de la hipótesis. En adultos inmunocompetentes, la prevalencia promedio es de 5.4% analizando la casuística de 7 estudios; en dos de estos la incidencia fue cercana a 20%.

En pacientes portadores de VIH/SIDA la prevalencia fue de 10 a 69% según diferentes estudios realizados en especímenes de producto de LBA, autopsias, esputo y otros, evaluados con distintos métodos de PCR. También se han estudiado poblaciones con enfermedades inmunosupresoras no relacionadas a VIH/SIDA, encontrándose prevalencia de 15 a 59%, con las mismas técnicas. En adultos con enfermedad pulmonar subyacente, la prevalencia es amplia de cero a 100% de colonización. Sin embargo, estos resultados solo demuestran que dichos pacientes son reservorio del hongo, pero no aseguran el desarrollo de la enfermedad y sus consecuencias [31,33,34,35].

Actualmente las herramientas diagnósticas utilizadas en casi todos los laboratorios son la tinción con azul de toluidina, tinción de Giemsa y tinción de Gomori-Grocott. La probabilidad de encontrar el hongo en una muestra de LBA puede ser de 50 a 90% en pacientes con neumonía por *Pneumocystis*. El uso de técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) aumenta la sensibilidad de la microscopía. El desempeño de las técnicas de IFD se considera con buena sensibilidad (90%) y especificidad (94%) [29].

En un meta-análisis publicado en 2002, se estudia la utilidad de técnicas citoquímicas y el uso de la inmunofluorescencia para el diagnóstico de neumocistosis en especímenes (esputo inducido y lavado bronquio-alveolar) de paciente portadores de VIH/SIDA. El estudio se enfoca principalmente en deducir el valor de sensibilidad de las técnicas de IFD y citoquímicas, se demostró que en la inmunofluorescencia fue de 67.1% contra 43.1% de las técnicas citoquímicas [36]. La casa comercial Bio-Rad® por su parte, señala que su marca MonoFluo™ Kit *P. jirovecii*, posee una sensibilidad de 95% y especificidad de 100%.

2.2. FIEBRE DE ORIGEN DESCONOCIDO

El término Fiebre de Origen Desconocido (FOD), fue acuñado por Petersdorf y Beeson en 1961, cuando reportaron en la literatura médica 100 casos en los cuales se presentaba una entidad patológica con características específicas: 1) fiebre mayor de 38.5°C en diferentes ocasiones, 2) con duración mayor a 3 semanas y 3) sin presentarse un foco infeccioso aparente u otra situación que explicase de manera clara este estado clínico pese a una semana o más de estudio [37,38]. Posteriormente, en 1991, Durack y Street propusieron una nueva clasificación debido a que existían manifestaciones muy similares a la FOD pero que no se integraban del todo a los criterios de Petersdorf y Beeson. Por este motivo Durack y Street diseñaron el modelo que actualmente sigue con vigencia, que integra el aspecto principal que es la fiebre con otras características relevantes para su estudio. Su clasificación es: 1) Clásica; 2) Nosocomial; 3) Neutropénica; 4) Acompañada por el VIH [39].

La FOD tiene etiología diversa, particularmente en el paciente con inmunosupresión. Las estadísticas de las publicaciones internacionales muestran que las infecciones son una de las causas más comunes de FOD, seguida en frecuencia por las neoplasias. Propiamente Petersdorf y Beeson, en un estudio de 100 casos, reportaron 36% debidas a infecciones y 19% a neoplasias [37]. En 1982 Larson y Featherstone reportaron en una población de 105 pacientes una prevalencia de 30% y 31% de FOD debidas a infecciones y neoplasias, respectivamente [38].

En 1993 Knockaert y Vanneste, encontraron una incidencia a favor de la infecciones sobre las neoplasias de 23% y 7% respectivamente, y describiendo un aumento de incidencia en causas misceláneas en 28% y las no identificadas 24% de los casos, en una población estudiada de 199 pacientes [40]. De Kleijn *et al.* en 1997, presentaron nuevas estadísticas de un estudio en una población de 165 pacientes, encontrándose las causas no diagnosticadas en primer lugar con el 36% de los casos y las infecciones en segundo con 26% [41]. De las enfermedades infecciosas, la tuberculosis ha llegado a representar 20% de los casos según Knockaert y cols. en pacientes de edad avanzada. Otras causas comprobadas fueron la endocarditis, infecciones virales, abscesos bacterianos [42]. Sin embargo, no se nombra específicamente la incidencia de micosis, ni se explica si están incluidas en el apartado de “otras causas”.

Así también puede existir un porcentaje dentro de las causas no identificadas donde las micosis invasivas desempeñen un papel importante.

Se han estudiado micosis invasivas principalmente en pacientes con inmunocompromiso, donde se ha encontrado una asociación importante. Algunas de las poblaciones mejor estudiadas son los pacientes con VIH, pacientes postransplantados con terapia inmunosupresora, con malignidad hematológica y tumor sólido maligno donde la incidencia de las micosis llega a ser de 5% en países europeos [43]. Viscoli *et al.*, en 1995 estudiaron pacientes con micosis invasivas en 244 casos, donde 127 de ellos se asociaron a neutropenia febril. De los 244 pacientes, 55% presentaban algún tipo de malignidad hematológica y 34% tumores sólidos. En este estudio el principal patógeno encontrado fue *C. albicans* en 45% de los casos seguido de otras levaduras del mismo género [44].

En aquellos que son portadores de VIH con cuentas de linfocitos CD4+ bajas, se ha asociado la presencia de *P. jirovecii* en 5 a 13% de los casos de FOD, según resultados presentados por Jani y Mehta en 2002 [45]. El género *Cryptococcus* está altamente relacionado en pacientes con VIH, donde 80% de los casos de meningoencefalitis se deben a este hongo, con subsecuente fungemia hasta en 40% de los reportes [46].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios multicéntricos en diferentes partes del mundo, así como hospitales de Latinoamérica y propios de la Ciudad de México, demuestran que las micosis invasivas son un problema de salud por la elevada morbilidad en los pacientes con inmunosupresión, donde la frecuencia es teóricamente de 10 a 26% y su mortalidad puede alcanzar cifras de 40%. Estos conocimientos obligan a hacernos tres preguntas principales: ¿Cuál es la prevalencia de micosis oportunistas invasivas en pacientes inmunosuprimidos con FOD del HE CMN SXXI? ¿Cuál es la distribución de las micosis oportunistas invasivas sobre ésta población inmunosuprimida? ¿Estamos utilizando los mejores métodos de diagnóstico para estudiar a nuestros pacientes? Por lo tanto, es prioridad la investigación de estas micosis, ya que el HE CMN SXXI, tiene una amplia población de pacientes que poseen características para desarrollar FOD de etiología fúngica relacionadas a inmunosupresión.

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, no existen datos formales sobre la FOD asociada a micosis invasivas en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI (UMAE HE CMN SXXI), y suponemos que son sub-diagnosticadas, debido a que el diagnóstico se realiza en base únicamente a la observación y aislamiento de los agentes; estos procedimientos en muchas ocasiones no es posible realizarlos en estos pacientes y actualmente para el diagnóstico no se incluyen pruebas serológicas de alta especificidad y sensibilidad, las cuales están disponibles desde hace varios años.

5. HIPÓTESIS

La principal causa de FOD en el HE CMN SXXI será *Candida* spp. y otras infecciones fúngicas tendrán menos frecuencia como aspergilosis y criptococosis. Estos resultados servirán para plantear nuevas estrategias diagnósticas sobre la etiología de FOD en pacientes con inmunosupresión, quienes serán los beneficiarios directos de los resultados alcanzados; el hospital podría abatir costos de internamiento y se evitarían, en algunos casos, decesos por estas infecciones.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

- Conocer la prevalencia de las infecciones micóticas oportunistas invasivas como causa de FOD en pacientes inmunosuprimidos del HE CMN SXXI.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer la prevalencia de candidosis, aspergilosis, criptococosis y neumocistosis en pacientes inmunosuprimidos con FOD.
- Establecer concordancia entre los estudios de visualización y aislamiento de hongos en pacientes con FOD y las pruebas de detección inmunológicas que se emplearán en ésta investigación, con el fin de determinar el desempeño de los estudios inmunológicos como auxiliares diagnósticos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. UNIVERSO DE TRABAJO

Se incluyeron de Octubre 2009 a Marzo 2010, a todos los pacientes del HE CMN SXXI con FOD que cumplieron los siguientes criterios:

7.1.1. Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años hospitalizados del HE CMN SXXI.
- Paciente con antecedente de enfermedad y/o tratamiento inmunosupresor.
- El paciente debe ser clasificable en criterios de FOD según Durack y Street;
 - **FOD clásica**
 - Temperatura 38,3°C comprobada en diversas ocasiones.
 - Duración 3 semanas.
 - Ausencia de diagnóstico a pesar de un estudio adecuado en al menos 3 visitas en la consulta externa o 3 días de hospitalización.
 - **FOD en la infección por el VIH**
 - Infección confirmada por el VIH.
 - Temperatura 38,3°C comprobada en diversas ocasiones.
 - Duración 3 semanas en el paciente hospitalizado y 4 semanas en el paciente externo.
 - Ausencia de diagnóstico tras 3 días de estudio adecuado, incluyendo en ellos 2 días de incubación de cultivos microbiológicos.
 - **FOD relacionada con neutropenia**
 - < 500 neutrófilos/mm³ en sangre periférica o riesgo de que bajen de esta cifra en un plazo de 1-2 días.
 - Temperatura 38,3°C comprobada en diversas ocasiones.
 - Ausencia de un diagnóstico tras 3 días de estudio adecuado, incluyendo en ellos 2 días de incubación de cultivos microbiológicos.

- **FOD nosocomial**
 - Temperatura 38,3°C comprobada en diversas ocasiones en un paciente hospitalizado y sometido a cuidados agudos.
 - Ausencia en el momento del ingreso de infección o incubación de ella.
 - Ausencia de un diagnóstico tras 3 días de estudio adecuado, incluyendo en ellos 2 días de incubación de cultivos microbiológicos.

7.1.2. Criterios de exclusión

- Se excluyeron aquellos pacientes que no tenían los criterios para ingresar a una de las clasificaciones de FOD y su estado de inmunosupresión era dudoso.

7.2. PROCEDIMIENTOS

- A partir de los especímenes obtenidos de cada paciente se intentó visualizar o aislar el agente de: candidosis, aspergilosis, criptococosis y neumocistosis y además se le realizaron las pruebas serológicas correspondientes.
- Visualización de hongos: Se emplearon preparaciones en fresco y fijas de diversos especímenes.
- Aislamiento de agentes: Los especímenes fueron sembrados rutinariamente en medios de agar dextrosa Sabouraud y agar dextrosa Sabouraud con antibióticos a 25°C y 37°C.
- Identificación del agente micológico:
 - Morfología macroscópica y microscópica de los aislados.
 - Estudios fisiológicos: auxanograma y métodos automatizados.

7.2.1. Especímenes

- Suero.
 - Se obtuvo sangre con técnica aséptica, por medio de punción venosa periférica en tubo seco, estéril al vacío. La muestra de sangre total se centrifugó a 3500rpm x 15 min para separar el suero y se utilizó inmediatamente, en su defecto, se congeló a -70°C para su análisis posterior.

En este espécimen se intentó detectar la presencia de los antígenos circulantes de *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Candida*, presentes principalmente en micosis sistémicas.

- Producto de lavado traqueal y bronquio-alveolar.
 - La muestra se obtuvo de paciente con sonda orotraqueal previamente colocada, se realizó lavado traqueal bajo condiciones de asepsia y esterilidad con trampa de Lukens o recipiente estéril para el lavado traqueal.
 - El lavado bronquio-alveolar se realizó conforme los requerimientos del médico tratante bajo broncoscopía.

Estos especímenes, se utilizaron para la observación directa en búsqueda de estructuras fúngicas por aclaramiento, tinciones compuestas y cultivos. En este tipo de espécimen se realizó también la captura de antígeno de *Cryptococcus* spp., así mismo se utilizó para la observación de quistes de *P. jirovecii* por inmunofluorescencia directa.

- Orina.
 - Se obtuvo mediante sonda de Foley. Cuando había control de la micción, se obtuvo en recipiente estéril por la técnica del chorro medio, previa asepsia y antisepsia de la región.

El estudio de la orina fue utilizada para la visualización y el aislamiento de agentes micóticos que invaden el tracto urinario, específicamente se utilizó para la visualización microscópica con tinciones y cultivo. También se realizó la búsqueda de antígeno de *Cryptococcus* spp.

- Producto de aspirado de médula ósea.
 - Se incluyeron las muestras obtenidas bajo condiciones de asepsia y antisepsia mediante los métodos convencionales de extracción de médula ósea de esternón o cresta ilíaca.

Las micosis sistémicas pueden invadir cualquier órgano, por lo tanto, en este material se intentó la visualización y aislamiento de los agentes fúngicos. Las pruebas inmunológicas empleadas, no están validadas en este espécimen.

- Esputo.
 - Se incluyeron aquellas muestras que hayan sido tomadas el mismo día de la entrega al laboratorio (preferentemente aquellas obtenidas como primera expectoración del día) en frasco estéril.

El esputo es la muestra alternativa al producto de LBA para el estudio de micosis invasiva en el paciente con FOD; con este material se realizaron tinciones y cultivo.

- Líquido cefalorraquídeo.
 - Se incluyeron las muestras obtenidas por punción lumbar con previa asepsia y antisepsia mediante técnicas habituales y sin datos de obtención traumática.

El líquido cefalorraquídeo fue utilizada para la búsqueda de micosis invasivas, en particular criptococosis mediante tinta china y tinciones compuestas, cultivo y búsqueda de antígeno de *Cryptococcus* spp. por aglutinación de látex.

7.2.2. Visualización, cultivo e identificación de hongos

- **Examen directo con KOH al 15%**
 - Se pone una gota del espécimen a estudiar y una gota de KOH en un portaobjetos, se coloca el cubreobjetos y se observa con el objetivo seco débil y seco fuerte (100x y 400x respectivamente).
 - Se utiliza para orina, esputo, LBA, orina, LCR y otros.

- **Tinción de Gram**
 - Se coloca una gota de muestra en un portaobjetos, se fija con calor y se tiñe siguiendo el método de Gram:
 - Cristal violeta 60 segundos
 - Lugol 60 segundo
 - Decoloración con alcohol acetona
 - Safranina 60 segundos
 - Se permite secar al aire y se observa con objetivo seco débil, seco fuerte e inmersión (1000x).
 - Se utiliza para orina, esputo, LBA, orina, LCR, tejidos y otros.

- **Tinción negativa con tinta china**
 - Consiste en aplicar una gota de tinta china y una gota de LCR en un portaobjetos, se coloca un cubreobjetos y se observa a seco débil y seco fuerte.
 - Se utiliza para LCR.

- **Tinción de Ziehl-Neelsen**
 - Se coloca una gota de la muestra a estudiar y se fija con calor. Se tiñe con la técnica conocida:
 - Fuscina 5 minutos a punto de evaporación
 - Decoloración con alcohol-ácido
 - Contratinción con azul de metileno

- Se observa a seco débil, seco fuerte e inmersión.
 - Se utiliza para LBA, orina y LCR
- **Tinción de Giemsa**
 - Se realiza un extendido de la muestra para que quede una monocapa celular sobre el portaobjetos y se fija con metanol. Se tiñe con la técnica conocida:
 - Tinción de Giemsa 5 minutos
 - Se añade buffer de fosfatos 5 minutos
 - Se lava la muestra
 - Se observa con objetivo de inmersión.
 - Se utiliza para LCR, LBA, aspirado de médula ósea, sangre periférica y otros.
- **Cultivo de hongos**
 - Excepto el suero, todos los especímenes se cultivaron por estriación en dos tubos con agar dextrosa Sabouraud y dos más con agar dextrosa Sabouraud con antibióticos.
 - Un juego se incubó a 25°C y otro a 37°C.
 - Se observaron diariamente durante 21 días para detectar crecimiento.
- **Identificación de agentes**
 - Hongos filamentosos
 - Se identificaron por visualización macroscópica del cultivo y examen directo del cultivo, teñido con azul de algodón y evaluando las estructuras características de cada género y especie.
 - Hongos levaduriformes
 - Se utilizaron colonias aisladas previamente para evitar identificación cruzada; para el aislamiento se utilizó agar cromogénico y se identificaron por método automatizado y por auxanograma manual.
 - Para el método automatizado se utilizó la colonia aislada y se realizó una suspensión con una concentración de 2 McFarland y se asignó una tarjeta de identificación YST VITEK®2. También se asignó una tarjeta de antibiograma AST-YS01 VITEK®2.

- Para el método de auxanograma, se utilizó una colonia aislada y suspendida en los medios proveídos por el fabricante a las concentraciones recomendadas y se inoculó en los pocillos. La reacción se leyó a las 72 horas y se ingresaron los datos al programa apiWeb® para identificación del agente.

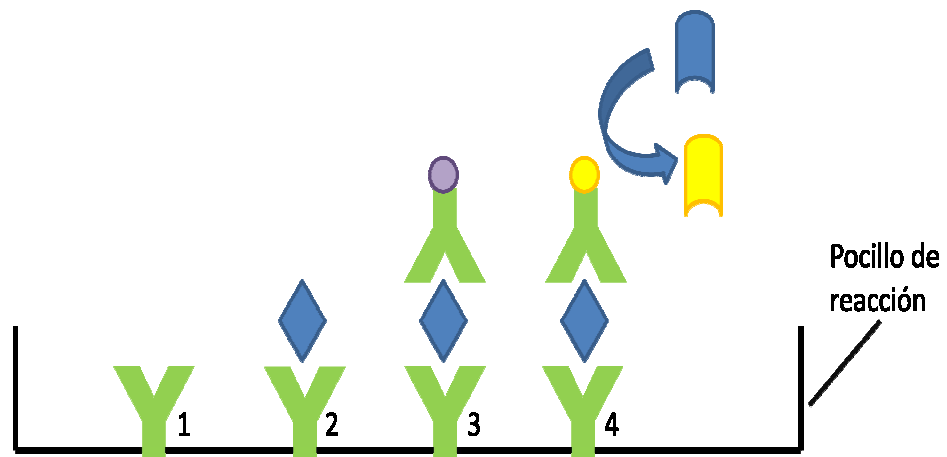
7.2.3. Serología y estudio de otros líquidos biológicos.

Se utilizaron equipos Bio-Rad® para el estudio inmunológico de cada uno de los especímenes.

- **Aspergillus (ensayo inmunoenzimático)**
 - Platelia™ *Aspergillus* EIA, es una determinación inmunoenzimática en sándwich en microplacas que detecta galactomanano en suero humano. En el método se utilizan anticuerpos monoclonales EBA-2 de rata, que se dirigen contra el galactomanano de *Aspergillus* spp (imagen 5, esquematiza los pasos de la técnica y sus reacciones esperadas).
 - Las muestras de suero (300µL), en viales herméticos de 1.5mL se tratan con calor a punto de ebullición por tres minutos en presencia de EDTA (100µL), para disociar los complejos inmunes y precipitar las proteínas de suero que podrían interferir con la prueba. Posteriormente se centrifugan los sueros en microcentrífuga a 10,000g x 10min. Se añade 50µL del conjugado (anticuerpo EBA-2/peroxidasa) y 50µL del sobrenadante del suero tratado a los pocillos recubiertos con anticuerpos monoclonales (EBA-2) y se incuban durante 90min ±5 a 37°C. Se formará un complejo anticuerpo monoclonal-galactomanano-anticuerpo monoclonal/peroxidasa, en presencia del antígeno galactomanano. Se lavan las tiras 5 veces para eliminar el material que no haya reaccionado con solución de lavado a base de tampón tris-NaCl, Tween® 20 y timerosal, que se incluye en el equipo y debe diluirse al 10%. A continuación, se añade la solución del sustrato-cromógeno

(tetrametilbenzidina + dimetilsulfóxido) por 30min a temperatura ambiente, que reaccionará con los complejos ligados al pocillo. Posteriormente se agrega 100µL de la solución de parada (H₂SO₄), y se lee la absorbancia de las muestras y controles con un espectrofotómetro configurado con una longitud de onda de 450 y 620nm (filtro de referencia).

Imagen 5.



Método de sándwich EIA. 1) El anticuerpo ("Y" verde) se encuentra unido al pocillo de reacción. 2) El antígeno (diamante azul) presente en el suero se une al anticuerpo del pocillo. 3) El anticuerpo ligado a peroxidasa(círculo violeta) se une al antígeno completando el "sándwich" . 4) Al añadirse el sustrato-cromógeno ocurre una reacción enzimática que se puede medir con un espectrofotómetro.

- Criterios de valoración y control de calidad:

El equipo incluye sueros de control negativo, umbral y positivo. La validez de la prueba se evalúa según densidades ópticas (DO), y se estiman así:

- DO DEL CONTROL UMBRAL (se corre por duplicado y se calcula el promedio): debe ser $\geq 0,300$ y $\leq 0,800$

- ÍNDICE DEL CONTROL NEGATIVO (IN): debe ser $< 0,400$

$$IN = \frac{DO\ DEL\ CONTROL\ NEGATIVO}{\bar{X}\ DE\ LA\ DO\ DEL\ CONTROL\ UMBRAL} < 0,400$$

- ÍNDICE DEL CONTROL POSITIVO (IP): debe ser $> 2,00$

$$IP = \frac{DO\ DEL\ CONTROL\ POSITIVO}{\bar{X}\ DE\ LA\ DO\ DEL\ CONTROL\ UMBRAL} > 2,00$$

- ÍNDICE DEL SUERO PROBLEMA (I):

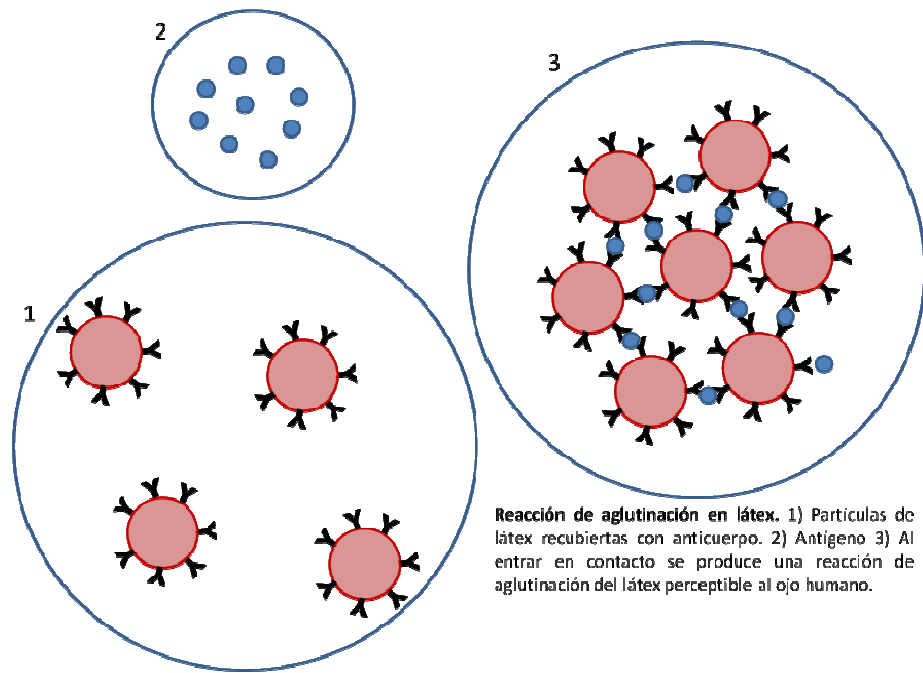
$$I = \frac{DO\ DEL\ SUERO\ PROBLEMA}{\bar{X}\ DE\ LA\ DO\ DEL\ CONTROL\ UMBRAL}$$

- Se considera POSITIVO si el índice es $\geq 0,50$.
- Se considera NEGATIVO si el índice es $< 0,50$.
- Si alguno de los sueros de control no se encuentra dentro de los rangos mencionados se invalida la corrida y debe repetirse el ensayo.

- **Candida (técnica de aglutinación de látex)**

- Pastorex™ *Candida* permite, mediante una técnica simple de aglutinación de partículas de látex, detectar el antígeno polisacárido de *Candida* (manano) en el suero. El manano es el componente más importante de la pared de la levadura y el principal antígeno circulante. En esta prueba se utilizan partículas de látex recubiertas de un anticuerpo monoclonal de rata EBCA-1 dirigido contra los β 1-5 oligomanósidos de *Candida*. El anticuerpo tiene afinidad por las especies (orden decreciente) *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* y *C. krusei* (imagen 6).

Imagen 6.



- Las muestras de suero (300 μ L), en viales herméticos de 1.5mL se tratan con calor a punto de ebullición por tres minutos en presencia de EDTA (100 μ L) para disociar los complejos inmunes y precipitar las proteínas de suero que podrían interferir con la prueba. Posteriormente se centrifugan los sueros en microcentrífuga a 10,000g x 10min. 40 μ L del sobrenadante se deposita en un círculo de la tarjeta de aglutinación + 10 μ L de látex *Candida*. Se homogeniza con una varilla y se coloca la tarjeta en un agitador a 160rpm x 10min a temperatura ambiente. Las partículas reaccionan con el antígeno polisacárido de *Candida* con una aglutinación que se aprecia a simple vista. El límite de sensibilidad es de 2,5ng/mL.

- Criterios de valoración y control de calidad:
El equipo incluye un control positivo compuesto por antígeno manano purificado que se lee en un círculo de aglutinación en presencia de látex *Candida* (debe ocurrir una aglutinación fácilmente visible).
El control negativo se realiza depositando tampón glicina y látex *Candida* en un círculo de aglutinación (no debe aglutinar).
El suero problema se considera POSITIVO en presencia de aglutinación visible al ojo desnudo.

- **Cryptococcus (técnica de aglutinación de látex)**

- Pastorex™ *Crypto* Plus, es una prueba cualitativa y semicuantitativa que mediante una técnica de aglutinación, permite detectar los polisacáridos capsulares glucuronoxilomanano (GXM) de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, que son las especies causales más frecuentes. Los especímenes para estudio son los siguientes: suero, líquido cefalorraquídeo, producto de lavado bronquio-alveolar y orinas. Esta prueba utiliza partículas de látex recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-GMX, principal componente de la cápsula de *C. neoformans* y *C. gattii*. Una reacción entre las partículas y el GXM se refleja por una aglutinación visible a simple vista. El límite de sensibilidad es de 50ng/mL para el suero. Existe una correlación directa entre la severidad de la infección y los títulos positivos en esta prueba (imagen 6, técnica de aglutinación en latex).
- Suero y producto de lavado bronquio-alveolar. Estas muestras se tratan de forma similar, depositando 120µL del espécimen en un tubo con tapón hermético en presencia de 20µL de enzima pronasa y llevándolo a 56°C durante 30min. Posteriormente se agrega una gota de solución de parada. Se depositan 40µL del espécimen tratado y se agrega 10µL de látex *Cryptococcus* en el mismo círculo de aglutinación, se homogeniza con una varilla y se coloca en un agitador a 160rpm x 5min a temperatura ambiente, posteriormente se lee la aglutinación.

- Líquido cefalorraquídeo. Se depositan 120µL del espécimen en un tubo con tapón hermético en presencia de 20µL de enzima pronasa y llevándolo a 56°C durante 30min. Posteriormente se lleva a punto de ebullición durante 3 minutos. Se deja atemperar 3-4min.

Se depositan 40µL del espécimen tratado y se agrega 10µL de látex *Cryptococcus* en el mismo círculo de aglutinación, se homogeniza con una varilla y se coloca en un agitador a 160rpm x 5min a temperatura ambiente y se lee la aglutinación.

- Orina. La orina se diluye únicamente en tampón glicina en relación 1:2. Se depositan 40µL de orina diluida en el tampón y se agrega 10µL de látex *Cryptococcus* en el mismo círculo de aglutinación, se homogeniza con una varilla y se coloca en un agitador a 160rpm x 5min a temperatura ambiente y se lee la aglutinación.

- Criterios de valoración y control de calidad.

El equipo incluye un control positivo con GXM a concentración de 200ng/mL, se hace reaccionar con el látex en un círculo de aglutinación, dando una reacción positiva visible al ojo desnudo. El control negativo se realiza combinando 40µL de tampón glicina con el látex y no debe aglutinar.

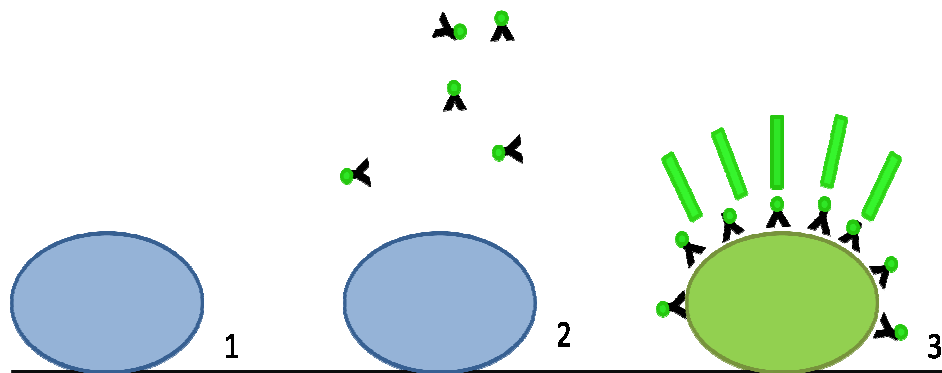
El espécimen problema se considera POSITIVO cuando existe aglutinación perceptible al ojo desnudo.

- ***Pneumocystis jirovecii* (técnica de inmunofluorescencia directa)**

- MonoFluo™ Kit *P. jirovecii*, es una prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) para la visualización del *P. jirovecii* en muestras de lavado bronquio-alveolar y esputo inducido (imagen 7).

- Se incluyeron únicamente muestras de fluido de lavado bronquio-alveolar, ya que presentan mayor sensibilidad para el estudio de la neumocistosis y por no requerir pretratamiento de las muestras. Las muestras de lavado bronquio-alveolar (3-4mL aprox.) son centrifugadas a 3,000g por 5min. Se retira el sobrenadante con pipeta Pasteur dejando 0.5mL aproximadamente. Se resuspende el botón y se colocan dos o tres gotas en un pocillo de las platinas. Se dejan secar al aire y posteriormente se agrega acetona 10% para fijar la muestra y se deja secar durante 10min. Se agrega después dos a tres gotas del conjugado, compuesto de anticuerpo anti *P. jirovecii* marcado con isocianato de fluoresceína (FITC) y azul de Evans. Se incuba durante 30min en cámara húmeda en la oscuridad. Terminado el tiempo de incubación, se lava con agua desionizada en canastilla durante un minuto. Se deja secar al aire y se coloca una gota de medio de montaje. Se lee bajo un microscopio de fluorescencia.

Imagen 7.



Técnica de Inmunofluorescencia Directa. 1) La muestra con *P. jirovecii* se encuentra en el pocillo de la platina. 2) Se agrega el anticuerpo marcado con FITC y azul de Evans. 3) Los anticuerpos se adhieren a la pared celular y el microorganismo puede ser observado bajo un microscopio de fluorescencia.

- Criterios de valoración y control de calidad:

A diferencia de los otros equipos antes mencionados, MonoFluo™ Kit *P. jirovecii* no cuenta con controles positivos ni negativos, esto pudiera ser un contratiempo para la fiabilidad de la prueba. Como “control positivo” nosotros utilizamos una platina montada con la misma técnica con una muestra positiva para *P. jirovecii*, recuperada de un lavado bronquio-alveolar de un paciente con neumocistosis del Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez” (imagen 8).

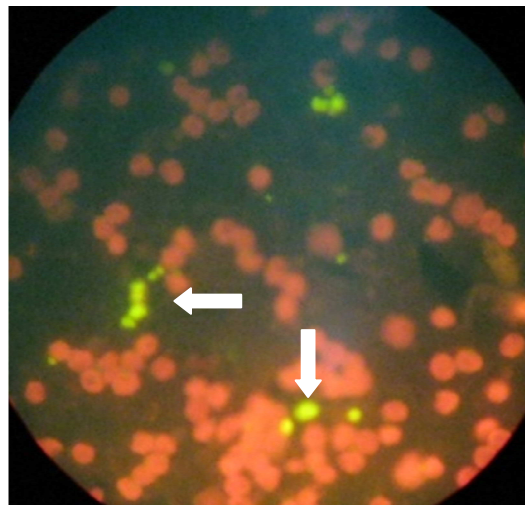


Imagen 8. Inmunofluorescencia Directa para *P. jirovecii* positiva (control positivo), obtenida de un LBA de un paciente del Hospital Infantil de México. Nótese los quistes color verde manzana (flechas) entre células inflamatorias (color rojo).

7.2.4. Equipos utilizados

- **Equipo de identificación automatizado.**
 - VITEK®2, bioMérieux®; Durham NC/USA
 - Tarjetas de Identificación:
 - YST VITEK®2, bioMérieux®; Durham, NC, USA; LOTE 243147310.
 - AST-YS01 VITEK®2, bioMérieux®; Durham, NC, USA; LOTE 281149310.

- **Equipo de auxanograma.**
 - api®20 C AUX, bioMérieux®; Marcy l’Etoile, FRANCE; LOTE 819320001.

- **Equipos inmunológicos.**
 - Pastorex™ *Candida*, BIO-RAD®; Marnes la Coquette, FRANCE; LOTE 9D2123.
 - Pastorex™ *Crypto* Plus, BIO-RAD®; Marnes la Coquette, FRANCE; LOTE 9J2108.
 - Platelia™ *Aspergillus* EIA, BIO-RAD®; Marnes la Coquette, FRANCE; LOTE 8K2069 y 9F2371.
 - MonoFluo™ Kit *P. jirovecii*, BIO-RAD®; Redmond, WA, USA; LOTE 960757.

7.2.5. Instalaciones

- Laboratorio de Investigación Médica en Dermatología y Micología “UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI”.
- Laboratorio Central “UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI”.
- Laboratorio de Inmunobioquímica “UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI”.

7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Se trata de un estudio observacional, descriptivo y transversal.

- Para la evaluación estadística , se aplicaron las siguientes pruebas:
 - Medidas de tendencia central (prevalencia, promedio, desviación estándar).
 - Para el análisis de las frecuencias y la población estudiada.

 - Índice de concordancia de *Kappa* modificada.
 - Para definir la concordancia de los métodos inmunológicos con nuestras pruebas estándar (cultivo y microscopia).

 - Teorema de Bayes
 - Para definir sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de las pruebas inmunológicas.

 - Prueba de *t* de Student
 - Para analizar las diferencias poblacionales de edad, cuenta total de linfocitos y neutrófilos entre los pacientes con y sin micosis invasivas.

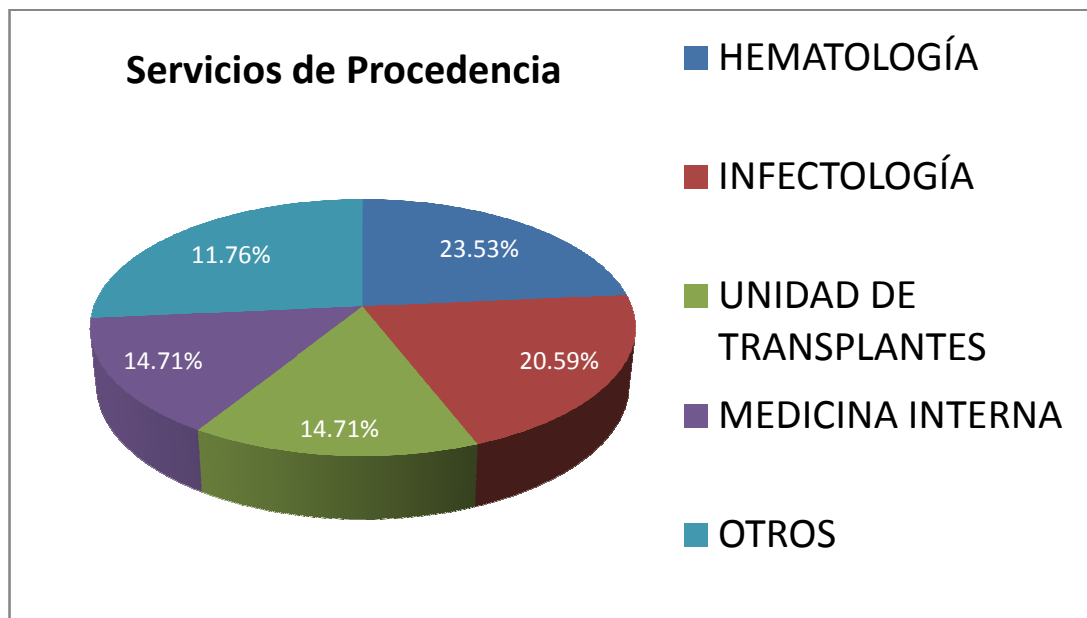
8. RESULTADOS

Después de seis meses, se estudiaron en este protocolo un total de 34 pacientes que desarrollaron fiebre de etiología desconocida, con la característica de padecer enfermedades inmunosupresoras y/o recibir tratamiento inmunosupresor y que fueron admitidos en el HE CMN SXXI.

8.1. DISTRIBUCIÓN POR EDAD, GÉNERO Y SERVICIO DE PROCEDENCIA

Los casos registrados de FOD fueron de 50% en cada género (17 casos en cada uno). El rango de edad de los pacientes fue 18 a 77 años con un promedio de 40.58 años (DE ± 15.91). Los servicios de procedencia fueron: Hematología, 8 pacientes (23.53%); Infectología, 7 pacientes (20.59%); Unidad de Transplantes, 5 pacientes (14.71%); Medicina Interna, 5 pacientes (14.71%); Unidad de Cuidados Intensivos, 4 pacientes (11.76%); Neurocirugía, 3 pacientes (8.82%); Reumatología, 2 pacientes (5.88%); en la imagen 9 se resumen estos datos.

Imagen 9. Porcentaje de pacientes estudiados según el servicio médico de procedencia (Servicio de procedencia de 34 pacientes con FOD).



8.2. TIPOS DE FIEBRE DE ORIGEN DESCONOCIDO

Los pacientes se integraron en las distintas subclasificaciones de FOD: las más frecuentes fueron la Clásica con 52.94% y Neutropénica 38.24%, con 18 y 13 casos respectivamente; el resto se muestran en la imagen 10.

8.3. PREVALENCIA DE MICOSIS OPORTUNISTAS INVASIVAS EN PACIENTES CON FOD.

De los 34 pacientes inmunosuprimidos con FOD estudiados, 52.94% ($n=18$) de los casos fueron de origen infeccioso y la prevalencia de las micosis oportunistas invasivas se estimó en 35.29% ($n=12$). Otras causas de la FOD fueron las neoplasias y tumoraciones del sistema nervioso central. De los 12 pacientes con micosis invasivas, la prevalencia específica de los géneros fueron: 50% ($n=6$) por el género *Candida*, el género *Aspergillus* 33.33% ($n=4$) y 16.67% ($n=2$) por el género *Cryptococcus* (imagen 11 y 12).

Imagen 10. Porcentaje de casos y distribución de las subpoblaciones de pacientes con FOD

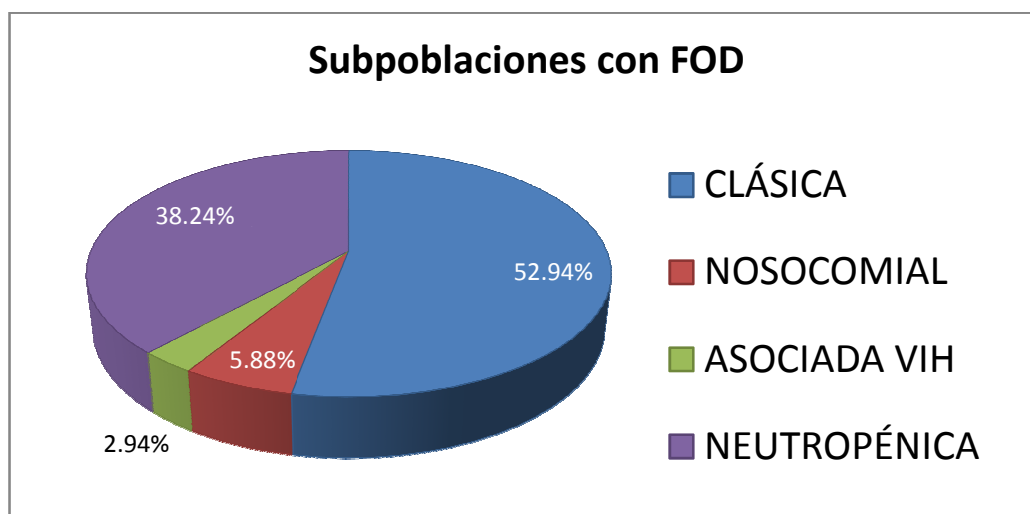


Imagen 11. Frecuencia (prevalencia) de micosis invasivas oportunistas según su etiología en doce casos de micosis.

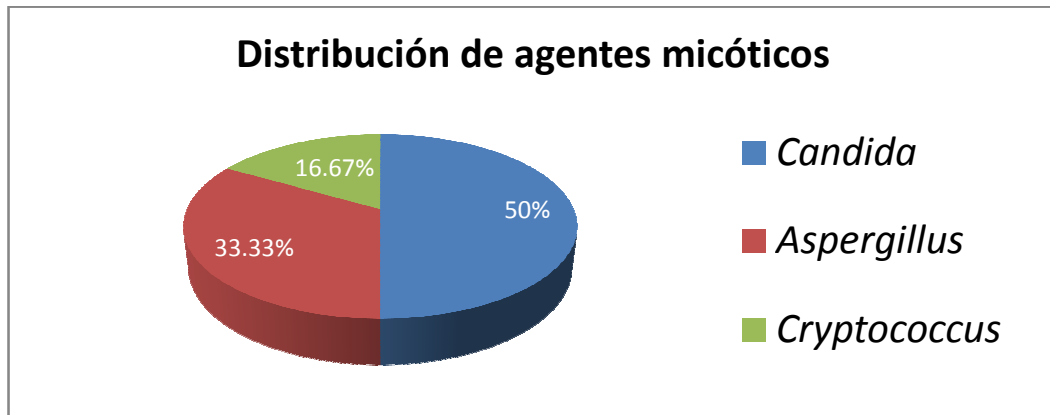
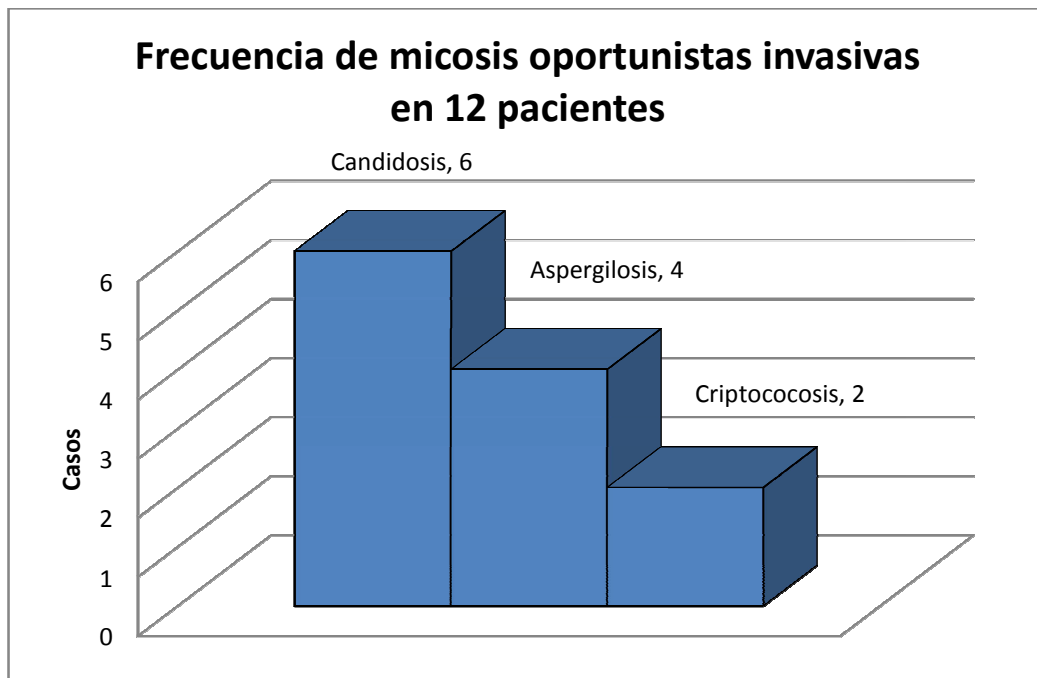
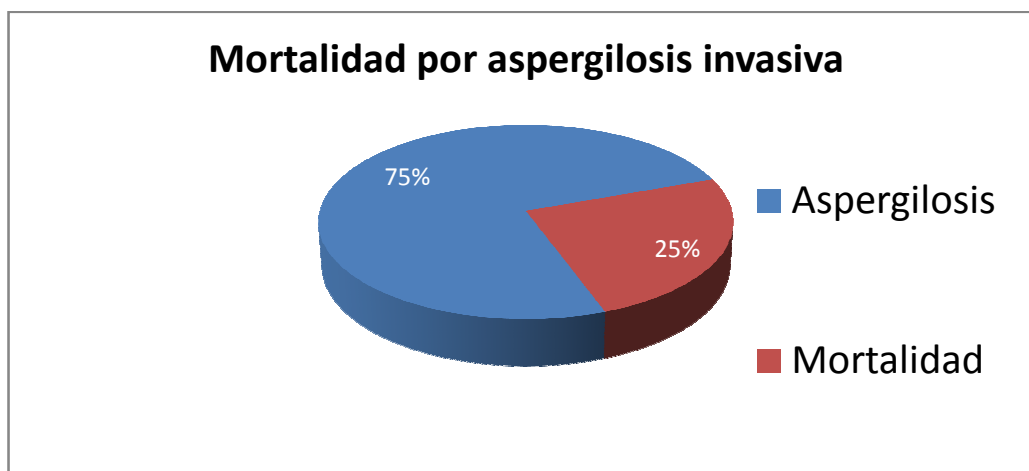


Imagen 12. Frecuencia de micosis invasivas oportunistas por número de casos diagnosticados.



Las aspergilosis estudiadas fueron, según su topografía: dos pulmonares (50%) y dos rinosinusales (50%). Una de las aspergilosis pulmonares evolucionó a muerte del paciente por lo que la mortalidad causada por el género *Aspergillus* fue de 25%, y 8.33% del total de las micosis (imagen 13).

Imagen 13. Porcentaje de mortalidad de los casos de aspergilosis invasiva en cuatro pacientes.

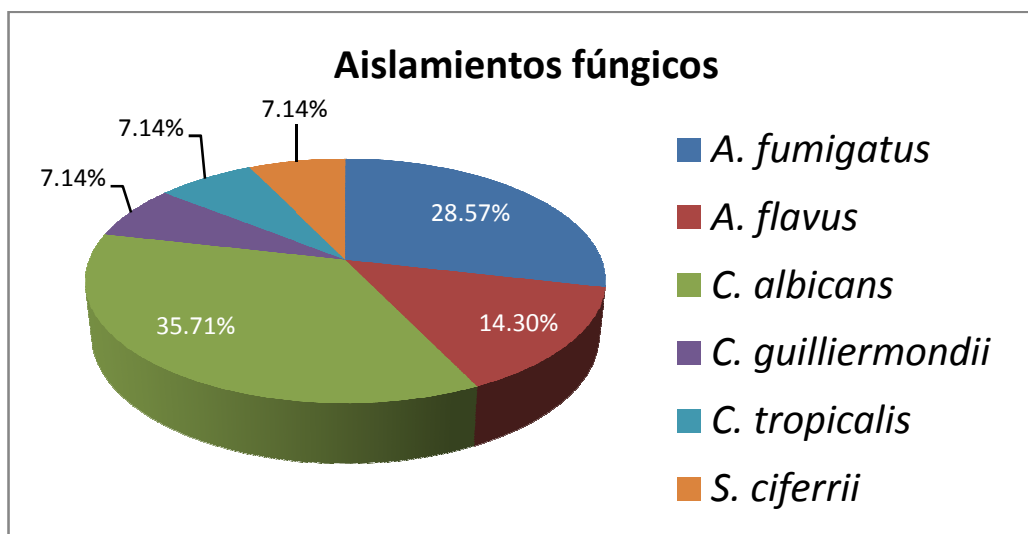


En total, se obtuvieron 104 especímenes diversos para el estudio de los pacientes (ver cuadro 7), de los cuales 70 se cultivaron; 28 de estos cultivos fueron positivos (40%). De estos 28 aislamientos, en 50% se recuperaron hongos ($n=14$) y el resto fueron bacterias. De los 14 aislamientos fúngicos (ver imagen 14), 42.86% fueron del género *Aspergillus* (cuatro aislamientos de *A. fumigatus*=28.57%; dos de *A. flavus*=14.30%) y 57.14% restante fueron levaduras (cinco ocasiones se aisló *C. albicans*=35.71%; en una ocasión *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* y *S. ciferrii*).

Cuadro 7. Número y tipo de especímenes recolectados de pacientes para la búsqueda de micosis invasivas oportunistas.

NÚMERO DE ESPECÍMENES ESTUDIADOS (Total= 104)	
Suero	34
Lavado bronquio-alveolar	14
Orina	13
Líquido cefalorraquídeo	11
Sangre periférica	11
Espujo	9
Tejido	4
Médula ósea	4
Improntas y exudados	3
Secreción nasal	1

Imagen 14. Porcentaje de agentes fúngicos aislados



8.4. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA Y FACTORES PREDISPONETES

Para identificar factores predisponentes para desarrollar micosis sistémicas en la población estudiada, se valoraron los siguientes parámetros: edad, conteo total de neutrófilos en pacientes neutropénicos y conteo total de linfocitos en pacientes linfopénicos.

Se aplicó la prueba de *t* de Student no pareada para conocer el valor de *p* de estos parámetros entre la población que desarrolló micosis y la que no presentó micosis. La edad promedio de los pacientes inmunosuprimidos sin micosis invasivas fue de 37.18 años (DE ± 14.74), mientras que el promedio de edad de los pacientes con micosis invasivas fue de 46.83 años (DE ± 16.99), y la diferencia de estas poblaciones arrojó un valor de $p = 0.0934$ ($t = 1.7294$), lo cual no es estadísticamente significativo.

La cuantificación total de linfocitos en pacientes linfopénicos que no desarrollaron micosis, tuvo una media de 0.3777×10^3 céls/ μL (DE ± 0.2556) y una media de 0.491×10^3 céls/ μL (DE ± 0.2249) en aquellos que presentaron micosis invasivas oportunistas; el análisis mostró un valor de $p = 0.3147$, sin significancia estadística ($t = 1.0326$). También se calculó el valor de *p* entre poblaciones neutropénicas: la cuantificación de neutrófilos de los pacientes neutropénicos sin micosis invasivas tuvo una media de 0.4370×10^3 céls/ μL (DE ± 0.4151) y 0.4333×10^3 céls/ μL (DE ± 0.2309) en los que sí

desarrollaron micosis, siendo entre estas dos poblaciones el valor de $p= 0.9888$ ($t= 0.0144$), lo cual no es estadísticamente significativo; todos estos datos se revisan en el cuadro número 8.

Cuadro 8. Evaluación de las características poblacionales y su significancia estadística (valor de p).

CARACTERÍSTICAS DE LAS POBLACIONES						
Parámetros	Media		Desviación estándar		t de Student	Valor de p
	SM	M	SM	M		
Edad	37.18	46.83	14.74	16.99	1.7294	0.0934
Conteo de linfocitos ($\times 10^3$ céls/ μ L)	0.3777	0.4912	0.2556	0.2249	1.0326	0.3147
Conteo de neutrófilos ($\times 10^3$ céls/ μ L)	0.4370	0.4333	0.4151	0.2309	0.0144	0.9888

Abreviaturas: **SM**= Pacientes sin micosis invasivas; **M**= pacientes con micosis invasivas.

8.5. DESEMPEÑO DE EQUIPOS INMUNOLÓGICOS

El desempeño de los equipos inmunológicos fue evaluado comparando los resultados obtenidos por el cultivo y aislamiento del agente, microscopia directa y con tinciones, así como los datos clínicos del paciente, obteniéndose los siguientes resultados: Platelia™ *Aspergillus* EIA presentó una sensibilidad y especificidad de 75% y 100% respectivamente; Pastorex™ *Crypto* Plus tuvo una sensibilidad de 100% y especificidad de 96.87%; Pastorex™ *Candida* no fue útil para el diagnóstico de candidosis invasivas, porque tuvo 0.0% de sensibilidad y 95.45% de especificidad; el desempeño de MonoFluo™ Kit *P. jirovecii* no se evaluó debido a que no se obtuvieron resultados positivos en los métodos estándar ni en el método inmunológico. En el cuadro número 9 se resumen estos datos.

Las pruebas inmunológicas se aplicaron en diversos especímenes y más de una vez en algunos pacientes. Se realizaron en total 153 estudios inmunológicos (32 pruebas de Pastorex™ *Candida*; 71 de Pastorex™ *Crypto* Plus, distribuidos en los siguientes especímenes: 34 sueros, 13 LBA, 13 orinas, 11 LCR; 34 de Platelia™ *Aspergillus* EIA; 16 de MonoFluo™ Kit *P. jirovecii*).

Cuadro 9. Desempeño presentado por los métodos inmunológicos en nuestro estudio.

DESEMPEÑO DE LA PRUEBAS INMUNOLÓGICAS				
	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Pastorex™ <i>Candida</i>	0.0%	95.45%	0.0%	77.77%
Pastorex™ <i>Crypto Plus</i>	100%	96.87%	66.66%	100%
Platelia™ <i>Aspergillus</i> EIA	75.0%	100%	100%	96.29%

Abreviaturas: *VPP*= Valor predictivo positivo; *VPN*= Valor predictivo negativo.

8.6. CONCORDANCIA ENTRE ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS

Se obtuvo el Índice de *Kappa* de Cohen modificado para conocer la concordancia entre los métodos inmunológicos y los métodos estándar antes señalados. Se obtuvieron los siguientes resultados: Platelia™ *Aspergillus* EIA con $\kappa = 0.8411$ (concordancia muy buena); Pastorex™ *Crypto Plus* $\kappa = 0.0$ (concordancia débil); Pastorex™ *Candida* $\kappa = 0.0$ (concordancia débil); MonoFluo™ Kit *P. jirovecii* $\kappa = 1$ (concordancia muy buena). Estos resultados serán analizados posteriormente en la discusión de forma detenida.

Cuadro 10. Índice de *Kappa* y su significado estadístico.

VALOR DE <i>Kappa</i>	
Índice obtenido	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Débil
0.41 – 0.60	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

8.7. IMÁGENES OBTENIDAS

A continuación se presentan algunas imágenes de las microscopías, cultivos y pruebas inmunológicas que fueron positivas en este protocolo.



Imagen 15. Cabeza aspergilar (flecha) observada en examen directo con KOH a 400x. Muestra de exudado de herida necrótica en un paciente con aspergilosis rinosinusal.

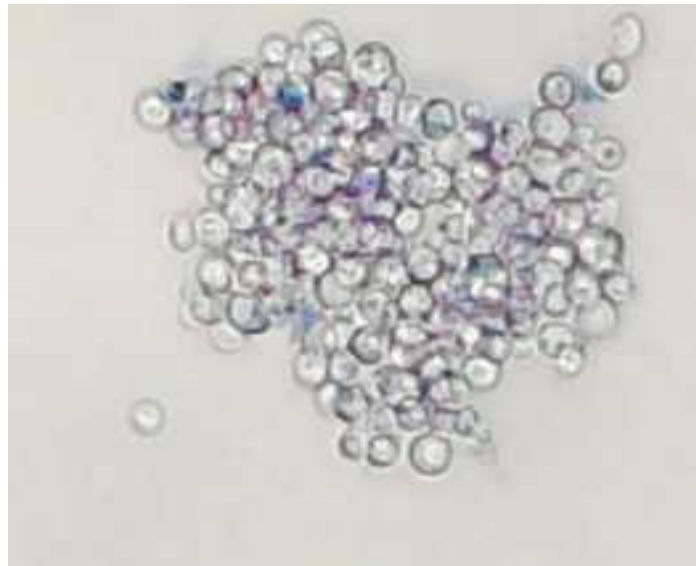


Imagen 16. Examen directo de un cultivo de *C. albicans* recuperada de una muestra de LBA.



Imagen 17. Cultivo de *A. flavus* de una aspergilosis rinosinusal.



Imagen 18. Cultivo de *C. albicans* obtenido de una muestra de LBA.



Imagen 19. Cultivo de *A. fumigatus* obtenido de un paciente con aspergilosis pulmonar.

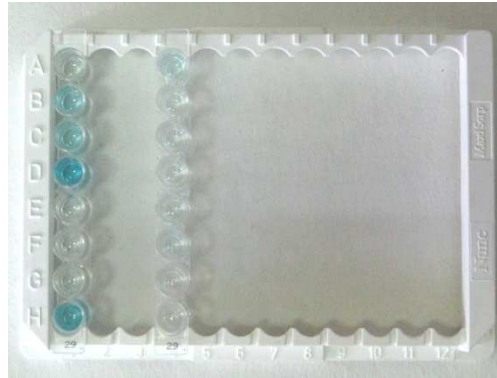


Imagen 20. Prueba de galactomananos por EIA. Obsérvese la primera tira de la posición "A-D" (controles negativo, umbral, umbral y positivo) y muestra "H" perteneciente a un paciente con aspergilosis. El resto de las muestras fueron negativas.

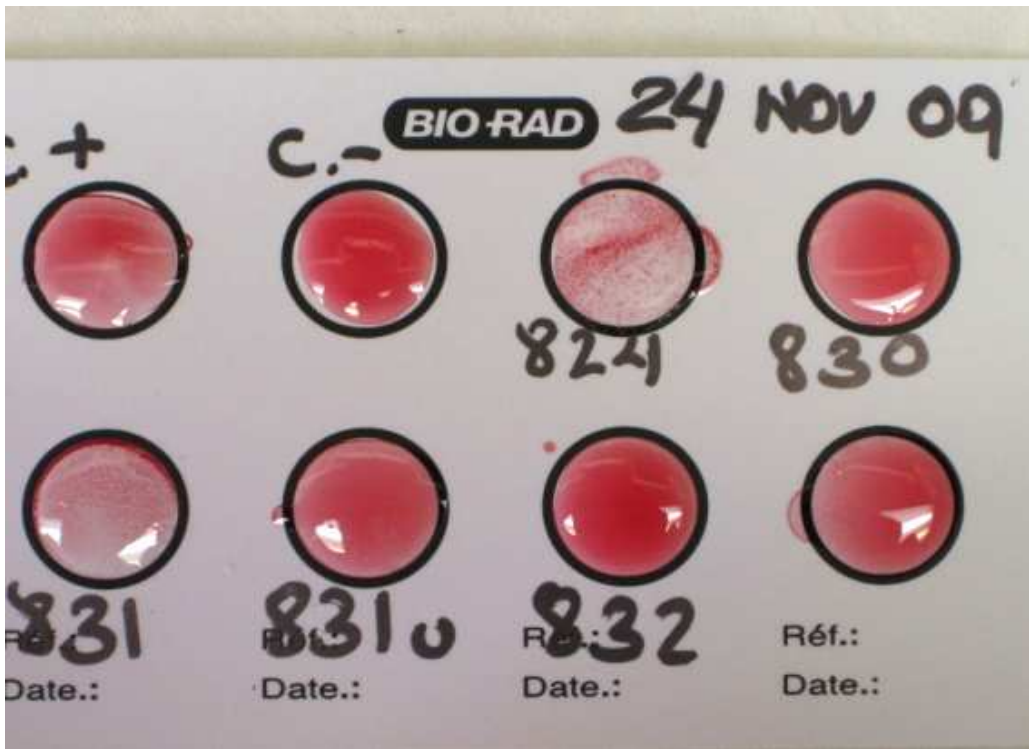


Imagen 21. Inmunoaglutinación en látex para *Cryptococcus* spp. Nótese las pruebas 824 y 831 son positivas.

9. DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en este protocolo difieren de otros estudios realizados en pacientes con FOD, ya que obtuvimos un porcentaje de 52.94% de FOD de origen infeccioso, mayor que 30% promedio manejado en la literatura revisada. La etiología infecciosa de la FOD, es en casi todos los estudios, la causa principal; sin embargo, pocas son las investigaciones donde los agentes micológicos se reportan. En nuestro estudio, la etiología infecciosa fue la de mayor frecuencia al igual que lo mostrado en los estudios de Knockaert *et al.* [40,42].

La prevalencia de micosis invasivas oportunistas fue de 35.29%, el género *Candida* fue el agente más aislado, tal como se pronosticó. El género *Candida* ha mostrado en últimos años evolución a la resistencia farmacológica, principalmente las especies *C. glabrata* y *C. krusei*, con una mortalidad de 10 a 49% cuando se presenta fungemia [47]. En este estudio no se aisló el agente de sangre; tampoco se presentó mortalidad por este género. Probablemente el sitio de infección tenga una correlación importante con la tasa de mortalidad por agentes del género *Candida*, lo cual pudiera ser una nueva línea de investigación. El diagnóstico de las candidosis en el presente estudio, fue en todos los casos, por métodos de visualización y aislamiento del agente en cultivo, ya que los equipos inmunológicos Pastorex™ *Candida* fueron insensibles a los antígenos de *Candida*. Existen otros estudios que demuestran sensibilidad de 0.0%, como el registrado por Gutiérrez *et al* [48], por lo que en estudios futuros no se emplearán estos equipos y tampoco se recomienda su uso en el IMSS.

Aunque algunos estudios han reportado sensibilidad (Pastorex™ *Candida*) desde 25% hasta 65% [13], los resultados obtenidos en este estudio y otros como el de Gutiérrez *et al.*, muestran que este producto no es una buena alternativa para el diagnóstico de las candidosis. Aunque, la sensibilidad del estudio puede variar debido al tiempo de evolución de la infección, el sitio de invasión, el uso de muestras seriadas y algunas otras variables preanalíticas, en nuestro caso, creemos que el uso de la inmunoaglutinación en látex no dan los beneficios que esperábamos, debido a que no disminuye el tiempo de respuesta de los análisis y la interpretación del resultado es difícil. Se demostró que los métodos tradicionales aún son superiores a ésta prueba inmunológica, tomando en cuenta el costo-beneficio.

La criptococosis, es una causa frecuente de micosis invasiva, en este estudio fue la causa de infección en 2 de 12 pacientes (16.67%). Diversos autores encuentran la criptococosis en 4% de los casos de micosis invasivas [47]. El 16.67% descrito en nuestro estudio, tal vez sea debido al tamaño de la muestra y la cantidad total de micosis invasivas estudiadas. Sin embargo, representa un porcentaje importante y debe ser considerado en los planes de atención por las autoridades hospitalarias. La participación de Pastorex™ *Crypto* Plus fue destacable en muchos aspectos, principalmente en aquellos pacientes donde el estudio microscópico y el aislamiento del agente fueron negativos, pero que la presentación clínica y los factores de riesgo de los pacientes sugerían la invasión del agente micótico. En las dos criptococosis que registramos, los pacientes presentaron mejoría significativa al inicio con tratamiento antifúngico. Consideramos que esta herramienta de diagnóstico debería estar disponible regularmente, ya que reducirá costos hospitalarios y en algunos casos evitar defunciones.

La prevalencia obtenida en este estudio de la aspergilosis en pacientes inmunosuprimidos, es muy cercana a lo reportado en otros estudios (30%) y mortalidad alta de hasta 80%, donde los pacientes con transplante de médula ósea y células hematopoyéticas son los más afectados [47]. En este protocolo no identificamos una población específica para la presentación de la infección y la mortalidad fue menor. Suponemos que la diferencia en la mortalidad pudiese estar relacionada al grado de inmunosupresión y la enfermedad de base relacionada.

Las pruebas inmunológicas Platelia™ *Aspergillus* EIA, para búsqueda de galactomananos en suero, fueron eficaces en la mayoría de los casos. En uno de los casos de aspergilosis rinosinusal, se envió tejido de producto de aseo quirúrgico a nuestro laboratorio y al laboratorio de anatomía patológica; nosotros aislamos *A. flavus* y observamos filamentos tipo *Aspergillus*, mientras que el departamento de anatomía patológica hizo diagnóstico de mucormicosis; la prueba de galactomananos fue positiva, descartando así mucormicosis. En otro caso de aspergilosis rinosinusal, se registró un falso negativo, que es atribuible a que la muestra de suero estudiada fue obtenida una semana después de tratamiento antifúngico (error preanalítico). También se analizó la probable interacción de la piperacilina/tazobactam y otros β -lactámicos, cefalosporinas y aminoglucósidos, sin encontrar falsos positivos por esta causa como se ha reportado en algunas publicaciones [21,22].

El uso oportuno de este método inmunológico, es muy importante en la atención del paciente inmunosuprimido con FOD en el futuro y en ocasiones decisivo: el tiempo de respuesta pudiera disminuir a solo horas, pudiendo iniciarse el tratamiento antifúngico el mismo día del ingreso del paciente, ampliando las posibilidades de éxito terapéutico, disminuyendo los días de hospitalización, las cirugías de urgencia y probablemente la mortalidad por estos agentes.

En relación a la ausencia de neumocistosis en los pacientes estudiados, es una prueba de los beneficios de la terapia HAART y profilaxis antibiótica contra hongos y bacterias que reciben los pacientes atendidos en este centro médico; lamentablemente, no todos los pacientes del país con VIH tienen acceso a estos tratamientos, por lo que la neumocistosis aún tendrá una morbilidad elevada en México durante varios años.

Pese a que la neumocistosis se ha reportado con frecuencia en pacientes con inmunosupresión e incluso en algunos casos, sin factor predisponente [29,30,31,32]. Todos nuestros pacientes fueron negativos al estudio por inmunofluorescencia, prueba que es de alta sensibilidad y especificidad. La efectividad de los equipos inmunológicos empleados quedó demostrada por el estudio positivo obtenido de una muestra control (imagen 8), cortesía del Laboratorio de Micología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, por lo que no dudamos que los pacientes estudiados estaban libres de infección por este agente.

El análisis de concordancia de *Kappa* de Cohen, realizado analizando los resultados de los estudios microbiológicos e inmunológicos, muestra resultados que debemos analizar detenidamente. En el caso de *Aspergillus* spp., la concordancia entre ambos métodos fue muy buena, por lo que deducimos que ambos métodos tienen una eficacia similar al momento de diagnosticar la enfermedad en el tipo de especímenes que analizamos; sin embargo, el método inmunológico tiene ventajas irrefutables, como diagnosticar aspergilosis en sitios anatómicos poco accesibles, un tiempo de respuesta reducido de 3 a 5 horas, comparado contra 3 a 5 días con los métodos de cultivo microbiológico; también hay una mejor sensibilidad y especificidad, resultando en una alta eficiencia y una alta relación costo-beneficio.

La concordancia para la criptococosis fue nula, ya que los dos casos fueron diagnosticados solo por métodos inmunológicos. Esto demuestra que los métodos inmunológicos tienen mayor eficacia y eficiencia y disminuyen el tiempo de espera para el inicio oportuno del tratamiento antifúngico. Por lo tanto, el uso de este equipo debiera ser utilizado de forma rutinaria al menos en los casos de una probable neuroinfección, ya que los estudios de microscopía y cultivo fueron obsoletos en estos casos.

En candidosis, tampoco hubo concordancia entre los estudios inmunológicos y los microbiológicos, solo que en este caso, los falsos negativos se presentaron en el equipo comercial, ya que falló en la detección de los seis casos de candidosis invasiva. Esto no descalifica a los métodos inmunológicos para el diagnóstico de candidosis, pero se requiere utilizar equipos con mejor sensibilidad como los que utilizan métodos inmunoenzimáticos; Platelia™ *Candida* EIA, pudiera tener mejores resultados y sería una línea de investigación interesante en un futuro.

El uso de MonoFluo™ *P. jirovecii*, obtuvo una concordancia muy buena con los métodos tradicionales, suponiendo que los pacientes estudiados no padecían neumocistosis y no eran portadores del hongo. Tanto los métodos de microscopía y los métodos de inmunofluorescencia fueron negativos, por lo que presentaron una concordancia perfecta. Aunque la prevalencia de neumocistosis pudiese ser baja en el HE CMN SXXI, el uso de inmunofluorescencia para diagnóstico de neumocistosis en las UMAE, debería ser considerada de rutina en los pacientes inmunosuprimidos con procesos neumónicos, principalmente en aquellos que son portadores de VIH/SIDA.

10. CONCLUSIONES

- Las micosis son una causa frecuente de infección en pacientes inmunosuprimidos con FOD (35.29%), que es mayor a la reportada en otras series en el mundo.
- La infección más frecuente fue la candidosis, seguida por la aspergilosis y la criptococosis.
- Los métodos microbiológicos de diagnóstico deben apoyarse en estudios inmunológicos, como se demostró en los casos de criptococosis.
- Los métodos inmunológicos son de utilidad para hacer el diagnóstico temprano de las micosis invasivas oportunistas, sin embargo, la inmunoaglutinación en látex para diagnóstico de candidosis no es útil porque no tuvo sensibilidad.
- Por la alta prevalencia de las micosis invasivas y por los resultados obtenidos en este estudio, los laboratorios de las Unidades Médicas de Alta Especialidad del CMN Siglo XXI, deben tener los recursos y el material necesario para el diagnóstico inmunológico de las infecciones fúngicas.

11. ANEXOS

CRONOGRAMA

ACTIVIDAD	SEP 2009	OCT 2009	NOV 2009	DIC 2009	ENE 2010	FEB 2010	MAR 2010	ABR 2010	MAY 2010	JUN 2010	JUL 2010	AGO 2010	SEP 2010	OCT 2010	NOV 2010
Registro de Protocolo	■														
Captación de pacientes		■	■	■	■	■	■								
Visualización y aislamiento de agentes		■	■	■	■	■	■								
Ensayos serológicos y de otros líquidos biológicos		■	■	■	■	■	■								
Análisis de resultados								■							
Redacción de la Tesis										■	■				
Publicaciones												■	■	■	■

ANEXO 2



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
U.M.A.E. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “DR. BERNARDO SEPÚLVEDA”
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN DERMATOLOGÍA Y MICOLOGÍA
Tel. 5627 6900 ext. 21480

HOJA DE CAPTACIÓN DE PACIENTES

Proyecto: “Frecuencia de micosis oportunistas invasivas en pacientes inmunosuprimidos con fiebre de etiología desconocida del Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS”

Nombre: _____ Nº. de afiliación: _____ Fecha: _____

Edad: _____ Género: _____ Servicio de procedencia: _____

Diagnóstico de ingreso: _____

Otras patologías: _____

Tratamiento: _____

Fecha de inicio de la FOD: _____

Clasificación de FOD: _____

Estudios y resultados para identificar causa de síndrome febril:

Hallazgos de Laboratorio: _____

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Duarte-Escalante E, López-Martínez R, Reyes-Montes MR, *et al.* Manuales Departamentales, Micología (Fasc. III). México D.F., México: UNAM; 2006.
- 2.- López-Martínez R. Importancia actual de la micología médica en México. *Gac Méd Méx* 2008; 144 (2): 121-122.
- 3.- Méndez-Tovar LJ, Anides-Fonseca A, Vázquez-Hernández A, Galindo-González M, Díaz-Madrid M, Berdón-Castro A, *et al.* Micosis observadas en cinco comunidades mexicanas con alto grado de marginación. *Gac Méd Méx* 2006; 142 (5): 381-386.
- 4.- Vázquez-del Mercado E, Arenas R. Micosis oportunistas en pacientes Inmunocomprometidos. *Gac Méd Méx* 2008; 144 (2): 131-133.
- 5.- Ascioğlu S, Rex JH, De Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, *et al.* Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (1): 7–14.
- 6.- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, *et al.* Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46 (12): 1813–1821.
- 7.- Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (10): 4419-4431.
- 8.- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20 (1): 133–163.
- 9.- Rinaldi MG. Epidemiology of mycoses in the HIV-infected patient: clinical aspects; *International Journal of Antimicrobial Agents* 1996; 6 (3): 131-134.

- 10.- Hernández-Hernández F, Córdova-Martínez E, Manzano-Gayoso P, López-Álvarez R, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Frecuencia de Micosis en Pacientes Inmunosuprimidos de un Hospital Regional de la Ciudad de México. *Salud Publica Mex* 2003; 45 (6): 455-60.
- 11.- Arredondo-García JL, Amábile-Cuevas CF, and the RedMic2 Study Group. Susceptibility of Mexican isolates of yeasts and moulds to amphotericin B and triazole antifungals; *J Infect Dev Ctries* 2009; 3 (5): 398-401.
- 12.- Herent P, Stinen D, Hernando F, Fruit J, Poulain D. Retrospective Evaluation of Two Latex Agglutination Tests for Detection of Circulating Antigens during Invasive Candidosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (8): 2158-2164.
- 13.- Pontón J. El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 20-25.
- 14.- Sendid B, Caillot D, Baccouch-Humbert B, Klingspor L, Grandjean M, Bonnin A, *et al.* Contribution of the Platelia *Candida*-Specific Antibody and Antigen Tests to Early Diagnosis of Systemic *Candida tropicalis* Infection in Neutropenic Adults. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (10): 4551–4558.
- 15.- White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of Non-Culture-based Methods for Detection of Systemic Fungal Infections, with an Emphasis on Invasive *Candida* Infections, *J Clin Microbiol* 2005; 43 (5): 2181–2187.
- 16.- Singh N, Paterson D. *Aspergillus* infection in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18 (1): 44-69.
- 17.- Montejo M. Infección invasora por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos en enfermos con trasplante de órgano sólido. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 9-12.

- 18.- Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahe´ V, *et al.* Detection of Circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by Real-Time PCR Assay of Large Serum Volumes Improves Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in High-Risk Adult Patients under Hematologic Surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (11): 3772–3777.
- 19.- Khot PD, Ko DL, Hackman RC, Fredricks DN. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infectious Diseases* 2008; 8 (73): 1-13.
- 20.- Husain S, Kwak EJ, Obman A, Wagener MM, Kusne S, Stout JE, *et al.* Prospective Assessment of Platelia™*Aspergillus* Galactomannan Antigen for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Lung Transplant Recipients; *Am J Transplant* 2004; 4 (5): 796–802.
- 21.- Sulahian A, Touratier S, LeBlanc T, Rousselot P, Derouin F, Ribaud P. False Positive *Aspergillus* antigenemia related to concomitant administration of Tazocillin; Abstract M-2062a, 43rd ICAAC Program.
- 22.- Viscoli C, Machetti M, Cappellano C, Bucci B, Bruzzi P, Bacigalupo A. False-Positive Platelia *Aspergillus* test in patients receiving Piperacillin/Tazobactam; Abstract M-2062b, 43rd ICAAC Program.
- 23.- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, *et al.* Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid A Tool for Diagnosing Aspergillosis in Intensive Care Unit Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177 (1):27–34.
- 24.- Hajjeh RA, Conn LA, Stephens DS, Baughman W, Hamill R, Graviss E, *et al.* Cryptococcosis: populationbased multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus–infected persons. *J Infect Dis* 1999; 179 (2):449–54.
- 25.- Sepkowitz KA. Opportunistic Infections in Patients with and Patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome; *Clin Infect Dis* 2002; 34 (8): 1098-1107.

- 26.- Chugh KS, Sakhuja V, Jain S, Talwar P, Minz M, Joshi K, *et al.* High mortality in systemic fungal infections following renal transplantation in third-world countries. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8 (2):168–72.
- 27.- O’Shaughnessy EM, Shea YM, Witebsky FG. Laboratory diagnosis of invasive mycoses. *Infect Dis Clin N Am* 2003; 17 (1): 135–158.
- 28.- Denis CM, Martinez A, El Moukhtar A, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E. The *Pneumocystis* life cycle; *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (3): 419-426.
- 29.- Jang-Jih L, Chao-Hung L; *Pneumocystis* Pneumonia. *J Formos Med Assoc* 2008; 107 (11): 830-842.
- 30.- Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, *et al.* Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (6):855– 61.
- 31.- Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and Clinical Significance of *Pneumocystis* Colonization. *J Infect Dis* 2008; 197 (1): 10-17.
- 32.- Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, *et al.* High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (11): 1029 –31.
- 33.- Spencer L, Ukwu M, Alexander T, Valadez K, Liu L, Frederick T, *et al.* Epidemiology of *Pneumocystis* Colonization in Families; *Clin Infect Dis* 2008; 46 (8): 1237-40.
- 34.- Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE, Denis CM, Miller RF. Limited Asymptomatic Carriage of *Pneumocystis jirovecii* in Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients. *J Infect Dis* 2003; 187 (6): 901-8.

- 35.- Su YS, Lu JJ, Perng CL, Chang FY. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with and without human immunodeficiency virus infection; J Microbiol Immunol Infect 2008; 41 (6):478-82.
- 36.- Cruciani M, Marcati P, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients; Eur Respir J 2002; 20 (4): 982–989.
- 37.- Petersdorf RO, Beeson PB. Fever of unexplained origin: report on 100 cases. Medicine (Baltimore) 1961; 40: 1-30.
- 38.- Larson EB, Featherstone HJ, Petersdorf RG. Fever of undetermined origin: diagnosis and follow-up of 105 cases, 1970–1980. Medicine 1982; 61 (5): 269–92.
- 39.- Durack DT, Street AC. Fever of unknown origin: reexamined and redefined. Curr Clin Top Infect Dis 1991; 11 (1): 35–51.
- 40.- Knockaert DC, Vanneste LJ, Vanneste SB, Bobbaers HJ. Fever of unknown origin in the 1980s: an update of the diagnostic spectrum. Arch Intern Med 1992; 152 (1): 51–55.
- 41.- DeKleijn EM. Fever of unknown origin (FUO). I. A prospective multicenter study of 167 patients with FUO, using fixed epidemiologic entry criteria. Medicine 1997; 76 (6): 392-400.
- 42.- Knockaert DC, Vanneste LJ, Bobbaers HJ. Fever of unknown origin in elderly patients. J Am Geriatr Soc 1993; 41 (11): 1187–92.
- 43.- Meunier F. Current clinical issues on mycoses in neutropenic patients. International Journal of Antimicrobial Agents 1996; 6 (1): 135-140.
- 44.- Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Martin P, Meunier F, the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). A surveillance study of fungemia in cancer patients. Abstract 44,7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2630 March 1995.

45.- Jani K, Mehta NJ. *Pneumocystis carinii* pneumonia presenting as a fever of unknown origin in a patient without AIDS. Heart Lung 2002; 31(1): 50–2.

46.- Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Launay O, Lortholary O, the French Cryptococcosis Study Group. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: The CryptoA/D Study. PLoS Med 2007; 4(2): e21.

47.- Pfaller MA, Pappas GP, Wingard JR. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. Clin Infect Dis 2006; 43(1): S3–14.

48.- Gutiérrez J, Maroto C, Piédrola G, Martín E, Perez JA. Circulating *Candida* antigens and antibodies: useful markers of candidemia. J Clin Microbiol 1993; 31: 2550-2552.