



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



**Evaluación de la utilidad clínica de la prueba Inmunoenzimática de detección
de Antígeno manano de *Candida* para el Diagnóstico temprano de la
Candidiasis invasiva en Pacientes pediátricos**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLOGA**

**PRESENTA:
DIANA EVELYN MARTÍNEZ GARNICA**



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: QFB. MARÍA ELSA ESCUDERO GARCÍA

VOCAL: QFB. MISAEL GONZÁLEZ IBARRA

SECRETARIO: DRA. BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ

1er. SUPLENTE: EBC. JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

2° SUPLENTE: DR. MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE MICOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
“FEDERICO GÓMEZ”**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB. MARCELA JIMÉNEZ JIMÉNEZ _____

SUSTENTANTE:

DIANA EVELYN MARTÍNEZ GARNICA _____

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno	min	Minutos
C.	<i>Candida</i>	NK	Natural Killer
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	nm	Nanómetros
Et. al.	Y colaboradores		
FN	Falso negativo	sp.	Especies
FP	Falso positivo	Th	Linfocitos T ayudadores
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez	TNF	Factor de necrosis tumoral
IL	Interleucina		
INF	Interferón	UCIN	Unidad de cuidados intensivos neonatales
LES	Lupus Eritematoso sistémico	UTIP	Unidad de terapia intensiva pediátrica
LLA	Leucemia Linfoide Aguda	VN	Verdadero negativo
LMA	Leucemia Mieloide Aguda	VP	Verdadero positivo
µL	Microlitros	VVP	Valor Predictivo Positivo
mL	Mililitros	VPN	Valor Predictivo Negativo

ÍNDICE

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
CANDIDIASIS. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	3
ANTECEDENTES HISTÓRICOS	4
DEFINICIÓN	5
CANDIDIASIS INVASIVA.....	6
DIAGNÓSTICO CANDIDIASIS INVASIVA	7
TRATAMIENTO DE LA CANDIDIASIS INVASIVA.....	10
ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE <i>Candida sp.</i>	11
RESPUESTA INMUNE FRENTE A HONGOS	13
TÉCNICA ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO MANANO.....	16
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
HIPÓTESIS.....	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	25
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	39
CONCLUSIONES.....	46
PERSPECTIVAS.....	47
REFERENCIAS.....	48

INTRODUCCIÓN

Las infecciones hematógenas adquiridas intrahospitalariamente son causa importante de morbilidad y mortalidad. El Hospital Infantil de México Federico Gómez notifica tasas de infección de 8.8 y 10 por cada 100 egresos. Dentro de estas, la Candidiasis invasiva es la cuarta causa de infecciones sanguíneas nosocomiales y su mortalidad asociada es mayor al 40%. Las infecciones ocasionadas por *C. albicans*, predominan en la mayoría de los reportes (60–80%), sin embargo en los últimos años se ha observado un incremento de casos ocasionados por especies de *Candida* no *albicans*.^{4; 37}

Se han implicado diversos factores de riesgo que aumentan la probabilidad de adquirir una candidemia, entre los que se encuentran: procedimientos terapéuticos, uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro y esteroides, citotóxicos, trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas y órganos sólidos, instalación de catéteres venosos, nutrición parenteral, neoplasias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), prematurez y diabetes mellitus. La severidad de la candidemia en el paciente pediátrico depende principalmente de la incapacidad e inmadurez de su sistema inmune para limitar el proceso infeccioso, así como los factores de virulencia del hongo y de las condiciones del microambiente en que se lleva a cabo la interacción hospedero-parásito.^{1; 2; 31.}

Se ha descrito que la mayoría de las candidiasis invasivas, tienen un origen endógeno a partir de una colonización previa de la boca, tracto intestinal, tracto genitourinario, o piel. Esta colonización previa también se ha identificado como un factor de riesgo independiente para adquirir candidemia en neonatos y pacientes neutropénicos. Sin embargo, el origen de las infecciones producidas por *C. parapsilosis* debe considerarse en su mayoría de origen exógeno ya que se suele adquirir a través de los fluidos intravenosos o del catéter. La evidencia de la adquisición endógena en la mayoría de las candidemias promueve la realización

de cultivos de vigilancia para evidenciar la colonización en los pacientes con riesgo.^{7; 14; 31}

Los signos clínicos de una candidiasis invasiva pueden ser no específicos y su diagnóstico se basa generalmente en hemocultivos, sin embargo un aislamiento de *Candida* puede tardar de 24 a 96 hrs y su recuperación es solo en 24-60% de los casos, esto debido a su baja sensibilidad (40%). Un día de retraso en el diagnóstico y el tratamiento, se asocia a un incremento de mortalidad, especialmente en pacientes con candidemia. Por lo tanto la identificación oportuna de una candidiasis invasiva tiene el potencial de incrementar la respuesta terapéutica antifúngica logrando así, su curación total.¹²

Debido al impacto clínico y la frecuencia de las candidemias, es necesario disponer de herramientas diagnósticas oportunas que nos permitan evaluar la presencia o no de una candidiasis invasiva. Actualmente existen técnicas inmunológicas que permiten detectar en un tiempo oportuno, moléculas representativas del agente patógeno en el suero de los pacientes.

El manano es un polisacárido de alto peso molecular presente en el 7% de la pared celular de *Candida* spp. y es uno de los principales antígenos circulantes durante la infección, que puede detectarse mediante una técnica inmunoenzimática tipo sándwich en microplaca. Esta técnica cuantitativa apoyada con los métodos micológicos convencionales (cultivos y examen directo), nos permite evaluar según los valores de corte si un paciente presenta o no una candidemia, contribuyendo así a un diagnóstico temprano y una adecuada terapia.^{19; 35}

Este estudio tiene como objetivo principal realizar una evaluación de la utilidad clínica de la detección de títulos de antígeno manano de *Candida* para el diagnóstico temprano de la Candidiasis invasiva en pacientes pediátricos internados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG).

MARCO TEÓRICO

CANDIDIASIS. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Candida sp. se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, formando parte de la microbiota normal en la piel, mucosas (bucal, faríngea y vaginal), tracto gastrointestinal del hombre y otros mamíferos. En individuos sanos suele encontrarse en forma comensal, sólo en determinadas condiciones puede invadir cualquier tejido del cuerpo desde su hábitat normal y manifestar carácter patógeno, por lo que es considerada como un patógeno oportunista.^{5; 25}

Dentro del reino *Fungae*, el género *Candida* ha sido clasificado en la clase *Ascomycetes*, familia *Saccharomycetaceae*. Se reproduce de forma sexual y asexual, de manera asexual mediante la formación de blastoconidios, mientras que sexualmente lo hace a través de ascosporas. El género *Candida* engloba a unas 150 especies de levaduras, que difieren por su capacidad de asimilar distintos compuestos de carbono, por la composición de polisacáridos de la pared celular y por la capacidad de presentar diferentes morfologías. Solo nueve de estas especies son patógenos para el hombre: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*.^{5; 21}

Los miembros pertenecientes a este género son unicelulares dimórficos, es decir que normalmente crecen como levadura (blastoconidios), pero bajo determinadas condiciones ambientales pueden formar otras dos morfologías fúngicas (pseudohifas o pseudomicelios y clamidoconidios) a excepción de *C. glabrata*; sin embargo solo *C. albicans* y *C. dubliniensis* son capaces de formar hifas verdaderas (micelio verdadero), estas dos especies son consideradas polimórficas. La pseudohifa o pseudomicelio se diferencia del micelio en el grosor y en la presencia de una constricción en las uniones septales, originándose células alargadas por gemación a partir de blastoconidios o de otra pseudohifa, que permanecen unidas a la célula parental, pudiendo llegar a parecer un verdadero micelio. Los clamidoconidios, son estructuras asexuales y de

resistencia, de formas globosas generadas a partir del micelio bajo determinadas condiciones desfavorables.^{21; 39}

Candida tiene varios atributos de virulencia para colonizar diversos sitios anatómicos del hospedero y ocasiona daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del mismo. Los factores de virulencia expresados o requeridos por el microorganismo para causar infección pueden variar según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del hospedero. Entre ellos se incluye la transición de morfología de blastoconidia a pseudohifa (dimorfismo), la expresión de invasinas y adhesinas en la superficie celular, la formación de biopelículas, el switching fenotípico y la excreción de enzimas hidrolíticas.^{11.}

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La Candidosis es una de las enfermedades micóticas conocidas desde la antigüedad. Hipócrates la describió en su obra *Epidemics*, observando lesiones en niños recién nacidos y en pacientes debilitados, que presentaban placas blanquecinas en la boca, a lo que se denominó estomatitis aftosa. En Francia Veron y Berg en 1835 describieron variedades clínicas de este padecimiento. En 1844 Bennet y en 1853 Robin, aislaron el hongo y reafirmaron que la enfermedad es propia de pacientes debilitados. En 1853 Robin le dio el nombre de *Oidium albicans*. Desde ese momento se acuñaron más de 100 sinónimos para *Candida albicans*, los dos que más persistieron fueron *Monilia candida* utilizado por Bonoderm y Hansen en 1868 y *Candida albicans* a partir de 1923 gracias a los trabajos de Langeron Talice.^{5.}

DEFINICIÓN

La Candidosis o Candidiasis es una micosis causada por diversas especies de hongos levaduriformes oportunistas del género *Candida*, especialmente *C. albicans*. Presenta una variedad de cuadros clínicos afectando principalmente mucosas, piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones e intestinos. Así mismo los procesos patológicos provocados son diversos y varían de irritación e inflamación a supuración crónica y aguda o respuesta granulomatosa.^{5; 25}

La Candidosis es generalmente una micosis endógena, dependiente de diversos factores que predisponen a padecerla (Tabla 1), por lo que es casi imposible determinar el periodo de incubación.⁵

Tabla 1 Infección por *Candida* y sus factores predisponentes (tomada de Bonifaz, 2012)

Tipo de Candidosis	Factor predisponente o de riesgo
Orofaringea	Diabetes mellitus, antibióticos, radioterapia (cáncer de cabeza y cuello) corticoesteroides inhalados y sistémicos, quimioterapia citotóxica, infección por VIH, Enfermedades hematológicas, trasplantes de órganos sólidos o de células madre
Esofágica	Corticoesteroides sistémicos, SIDA, cáncer, trasplantes de órganos sólidos o de células madre
Gastrointestinal	Cáncer, cirugías
Vulvovaginal	Anticonceptivos orales, embarazo, diabetes mellitus, corticoesteroides sistémicos, uso de antibióticos
Cutánea y Onicomycosis	Humedad local y oclusión, diabetes, inmersión de las manos en agua, enfermedad vascular periférica
Cutánea congénita	Cuerpo extraño intrauterino, prematurez
Mucocutánea crónica	Defectos en linfocitos T y procesos endócrinos
Tracto urinario	Catéter urinario infestado, obstrucción urinaria, procedimientos del tracto urinario, diabetes mellitus

Neumonía	Aspiración, inmunosupresión, trasplantes
Endocarditis	Cirugía mayor, endocarditis bacteriana o enfermedad cardíaca valvular, abuso de drogas intravenosas, catéter venoso central
Pericarditis	Cirugía torácica, inmunosupresión
Sistema Nervioso central	Cirugía del SNC, derivación del ventrículo peritoneal, cirugía ocular
Ocular	Trauma, esteroides tópicos, cirugías
Abdominal	Perforación recurrente, cirugía abdominal repetitiva, pancreatitis, diálisis peritoneal ambulatoria continua
Hematógena	Trasplante de órganos sólidos, colonización, uso prolongado de antibióticos, cirugía abdominal, cuidados intensivos, nutrición parenteral total, hemodiálisis, inmunosupresión, trasplante de hígado o de células madre.

CANDIDIASIS INVASIVA

Se utiliza el término de candidiasis invasiva (sepsis por *Candida*) para designar a la enfermedad producida por organismos del género *Candida* con infección de tejidos profundos del organismo, siendo los sitios más frecuentes de infección pulmones, riñones, hígado, bazo y cerebro. Las manifestaciones de la Candidiasis invasiva generalmente son inespecíficas y se pueden confundir con sepsis bacteriana, siendo en muchos de los casos la fiebre el único signo de infección.^{5; 42}

Es la cuarta causa de infecciones sanguíneas nosocomiales en Estados Unidos de Norteamérica y en otros países desarrollados y su índice de mortalidad varía de un 30 a un 70% en el caso de los pacientes inmunosuprimidos. El origen de la candidemia es fundamentalmente endógeno, a partir de una colonización previa de la boca, tracto intestinal, tracto genitourinario, o piel. Esta colonización previa también se ha identificado como un factor de riesgo independiente para adquirir candidemia en neonatos y pacientes neutropénicos. Mientras que sólo un 10% son de origen exógeno (por ejemplo colonización de catéter venoso).^{14; 19; 31}

Los pacientes con mayor riesgo de padecer candidiasis invasiva (CI) son aquellos con larga estancia hospitalaria, los ingresados en una Unidad de Terapia y

Cuidados Intensivos (UTI y UCI), los sometidos a procedimientos quirúrgicos, los pacientes onco-hematológicos y los neonatos prematuros. Así mismo se han implicado diversos factores de riesgo que aumentan la probabilidad de adquirir una candidemia, entre los que se encuentran: procedimientos terapéuticos, uso de antibióticos de amplio espectro y esteroides, citotóxicos, trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas y órganos sólidos, instalación de catéteres venosos, nutrición parenteral, neoplasias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y diabetes mellitus. En los niños con neutropenia, el grado y duración de ésta ha mostrado ser un factor de riesgo para desarrollar una candidemia (menos de 200 neutrófilos totales y más de 10 días de duración), así como la deficiencia en transferrina y/o Linfocitos T (CD₄⁺). La severidad de la candidemia en paciente pediátrico depende principalmente de la incapacidad e inmadurez de su sistema inmune para limitar el proceso infeccioso, de los factores de virulencia del hongo y de las condiciones del microambiente en que se lleva a cabo la interacción hospedero-parásito. ^{1; 2; 29; 31}

Las infecciones ocasionadas por *C. albicans*, predominan en la mayoría de los reportes (60–80%), sin embargo en los últimos años se ha observado un incremento de infecciones causadas por especies distintas (*Candida no albicans*) como *C. krusei* y *C. glabrata*, especies intrínsecamente resistentes a fluconazol, por lo que se ha atribuido el aumento de estas especies al abuso de este antimicótico y de las equinocandinas. En México, Arroyo y colaboradores en el año 2007, reportaron que el mayor aislamiento lo representa *C. albicans* (52%), seguido por *C. tropicalis* y *C. glabrata* 24% y 19% respectivamente. ^{3; 33}

DIAGNÓSTICO CANDIDIASIS INVASIVA

Los signos clínicos de una candidiasis invasiva pueden ser no específicos y su diagnóstico se basa principalmente en los hemocultivos que presentan una baja sensibilidad (menor al 50%) además de un retraso en el resultado (24 a 96 hrs) y la identificación de cultivos para *Candida* pueden ser positivos en solo el 24-60%

de los casos. Sin embargo sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de las micosis sistémicas.^{12; 40}

La positividad del hemocultivo depende de varios factores como la viabilidad de los blastoconidios, el inicio previo de una terapia antifúngica y el número de blastoconidios presentes en la muestra, sin embargo, el factor más importante que determina la positividad de esta prueba es el volumen de sangre procesada, debido a que más de la mitad de los pacientes septicémicos portan menos de un microorganismo por mL de sangre, así mismo, se recomienda tomar de forma aleatoria un mínimo de dos o tres muestras en un período de 24 horas. No obstante en pacientes pediátricos, en ocasiones, el volumen total de sangre extraído es tal, que el paciente desarrolla alteraciones hemodinámicas y anemia. La toma seriada de hemocultivo contribuye al desarrollo de tales complicaciones, por lo cual, a pesar de ser incorrecto, se prefiere tomar solo una con el fin de no afectar la homeostasis del niño.^{2; 27; 30}

La observación microscópica puede dar información preliminar sobre la presencia o ausencia de hongos en la muestra, gracias a la observación de elementos micóticos característicos: blastoconidios y pseudohifas. Su sensibilidad depende del tipo y cantidad de la muestra y del número de microorganismos presentes en ella. La infección invasora por *C. albicans* puede evidenciarse en preparaciones histológicas teñidas con PAS o Plata-metenamina o líquidos con tinciones de tipo Romanowsky, al observar una mezcla de levaduras y pseudohifas en el tejido. Un aumento de la sensibilidad de estas técnicas puede lograrse con la utilización de fluorocromos como el Blanco de calcoflúor, el Blankophor y el Rojo congo.⁴⁸

Los cultivos micológicos de sitios estériles, también presentan una baja sensibilidad (50%) y los cultivos positivos de muestras no estériles pueden deberse tanto a colonización como a infección, y la distinción entre ambas no siempre es fácil. No obstante el diagnóstico microbiológico es un paso esencial en el establecimiento de la etiología de las enfermedades, a través de la identificación de los aislamientos fúngicos a nivel de especie, ya que esta información es muy

importante para orientar el tratamiento antifúngico hasta que se dispongan de los resultados de sensibilidad *in vitro*.^{33; 34}

Las técnicas diagnósticas independientes del cultivo pueden proporcionar una valiosa ayuda a los métodos tradicionales para facilitar el diagnóstico de la Candidiasis invasiva, como la detección de antígenos como el manano, el β -1 \rightarrow 3 glucano, anticuerpos antimanano, y el DNA. Sin embargo estas técnicas presentan diversos inconvenientes.³³ (Tabla 2).

Tabla 2. Técnicas Microbiológicas para el Dx. de la candidiasis invasiva en la unidad de cuidados intensivos. (Tomada y modificada de Péman, 2012)

Técnica	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Ventajas	Inconvenientes
(1 \rightarrow 3)- β -D-glucano	70-100	87-96	Marcador panfúngico, sensibilidad y VPP elevados, útil en suero y otras muestras	Resultados falsos positivos. Experiencia limitada, dificultades metodológicas
Manano y anticuerpos antimanano	60-89	80-84	Buena especificidad y sensibilidad en combinación	Experiencia limitada
Anticuerpos antimicelio	77-89	91-100	Diagnóstico y control de la evolución, elevada especificidad	Experiencia limitada
Ácidos nucleicos	90	100	Elevada especificidad, útil en suero y otras muestras	Escasos métodos comercializados.
Combinación de métodos (manano y ácidos nucleicos)	87	100	Elevada especificidad, sensibilidad y VPP, Diagnóstico y control de la evolución	Costos elevados
Cultivo	50	100	Método de referencia, permite estudios de sensibilidad. Útil en sangre y otras muestras	Sensibilidad baja, lentitud.

Las técnicas serológicas son de gran ayuda en la obtención de un diagnóstico temprano de las micosis invasivas ya que pueden detectar tanto antígenos fúngicos (son independientes del estado inmunológico del paciente) como anticuerpos que se produce durante el desarrollo de la micosis, y aunque normalmente se utilizan de forma independiente, existen evidencias recientes de que su utilización combinada puede aumentar la sensibilidad del diagnóstico. Sin embargo un título de anticuerpos en pacientes con problemas hemato-oncológicos son muy bajos casi imperceptibles para las técnicas de detección de los mismos.

28; 34; 36

Para la detección de antígenos de *Candida sp.* es importante considerar que durante la infección, además de la multiplicación del microorganismo (invasión y/o colonización), simultáneamente hay destrucción de las levaduras, liberando fragmentos de pared, membranas, organelos y del contenido citoplasmáticos.²²

El diagnóstico temprano permite realizar un tratamiento adecuado en etapas tempranas de la enfermedad y esto genera una mayor posibilidad de disminuir la alta mortalidad de esta patología. Sin embargo, a pesar de las diferentes técnicas disponibles, no se conocen con exactitud cuáles serían las de mejor sensibilidad y especificidad en nuestro medio, especialmente para pacientes pediátricos en condiciones críticas.⁹

TRATAMIENTO DE LA CANDIDIASIS INVASIVA

Se dispone de gran variedad de medicamentos antifúngicos para el tratamiento de la candidemia, las guías actuales sugieren el tratamiento con anfotericina B, fluconazol, caspofungina o una combinación de anfotericina B y fluconazol en los casos comprobados o presuntos de candidemia. En pacientes pediátricos están aceptadas las formulaciones lipídicas de Anfotericina B cuya respuesta es equivalente a la anfotericina B desoxicolato; así mismo la caspofungina se ha utilizado en la población pediátrica, particularmente neonatal con buenos resultados. La decisión del tratamiento inicial depende de la estabilidad del paciente, la identificación de la especie, la exposición previa al fármaco, el tipo de medicamento, la disponibilidad y los efectos adversos.^{6; 10; 18; 23; 38.}

Se considera que la mortalidad a 12 semanas por *Candida sp.* es de 35.2% siendo *C. krusei* la de mayor índice de mortalidad con 52.9%. El retraso en el tratamiento puede aumentar la mortalidad; Garey y sus colaboradores (2012) reportaron la mortalidad del 15% de los pacientes cuando se inició el tratamiento con fluconazol en el día cero, 24% con un día de retraso, 37% con dos días y 41% con tres o más días. La anfotericina B es uno de los fármacos con mayor potencia antifúngica; produce efectos adversos (reacciones alérgicas, nefrotoxicidad, hipocalcemia, etc.) que se reducen con la prescripción de preparaciones lipídicas.

El tratamiento debe continuar, por lo menos, durante 14 días después del último cultivo positivo y hasta que los síntomas hayan desaparecido. Deben realizarse ajustes después de identificar la especie para reducir la toxicidad y los efectos adversos.^{6; 16; 18}

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE *Candida sp.*

La pared celular de *C. albicans* es una estructura dinámica y compleja que protege a la célula de la presión osmótica en medios hipotónicos y le confiere su forma característica. Además de su función en la morfogénesis, por ser la estructura celular más externa, la pared celular: 1) entra primero en contacto con las células del hospedero; 2) presenta importantes determinantes antigénicos del hongo 3) es responsable de la adherencia del patógeno y 4) modula la respuesta inmune del hospedero.²¹

La pared celular de las células fúngicas se encuentra compuesta por varias capas, formada en su mayoría por carbohidratos (80-90% del peso seco de la pared), mientras que las proteínas representan el 20% y los lípidos son un componente minoritario (1-7%). Los principales polisacáridos de la pared son de 3 tipos: (i) β -glucanos, que son polímeros de glucosa con uniones β -(1,3) y β -(1,6), (ii) quitina, que es un polímero lineal de N-acetil-D-glucosamina con enlaces β -(1,4) y (iii) manano, conjunto de polímeros de manosa unidos covalentemente a proteínas (manoproteínas).^{21; 24; 39} (Fig. 1)

Glucanos y quitina forman un esqueleto que da forma y aporta rigidez a la pared celular. Los β -glucanos son el principal polisacárido de la pared, aproximadamente el 60% del peso seco de la misma, mientras que la quitina es un componente minoritario (0.6-9%).³⁹

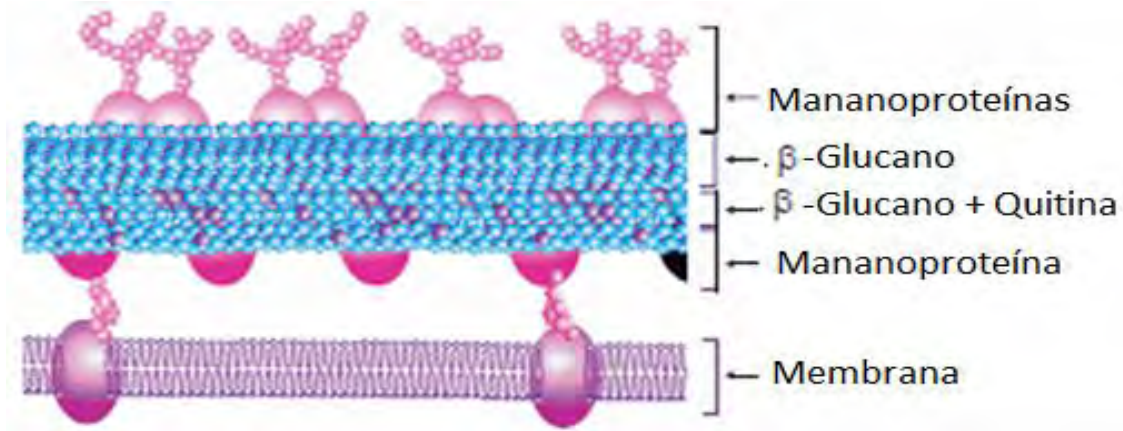


Fig. 1 Estructura interna de la pared celular de los hongos levaduriformes

El manano es un antígeno con un alto interés diagnóstico, pues se encuentra en la mayoría de las especies del género *Candida* de importancia médica. Representa el 40% de los polisacáridos de la pared celular, es un antígeno de alto peso molecular (>260 kDa) que es específico del micelio. La estructura del manano es compleja y está constituida por unidades de manosa que forman cadenas centrales largas unidas entre sí por enlaces alfa-1→6 y cadenas laterales cortas de unidades de manosa unidas entre sí por enlaces beta-1→2 y alfa-1→2.^{8; 24; 35}

En un paciente con candidiasis invasiva el manano se encuentra circulando en nanogramos por mL de sangre, lo que dificulta su medición mediante las técnicas inmunoenzimáticas. Esta molécula usualmente circula formando inmunocomplejos, los cuales son rápidamente clarificados de la sangre por el hígado y el riñón, haciendo necesario la realización de un muestreo frecuente para su detección, lo que disminuye la sensibilidad de la técnica. Es importante recordar que para realizar su detección es necesario disociar los complejos inmunes formados, utilizando enzimas proteolíticas o calor, que destruyen los anticuerpos y dejan libre al manano. La liberación del manano del inmunocomplejo además de la transitoriedad del manano en sangre, son los responsables de la baja sensibilidad de la prueba.^{17; 32; 36; 40; 43}

RESPUESTA INMUNE FRENTE A HONGOS

Las especies de *Candida* colonizan las mucosas gastrointestinal, genitourinaria y respiratoria, así como la piel. La transición entre la colonización y la invasión de mucosas o la diseminación de la infección depende principalmente de la respuesta que sea capaz de ofrecer el hospedero frente al hongo. La infección por *Candida spp.* se divide en dos grandes grupos: la infección mucocutánea y la invasora. La primera línea de defensa del hospedero frente a la *Candida* se encuentra a nivel de las mucosas. Entre estos mecanismos se incluyen un conjunto importante de proteínas salivares, como la lactoferrina, lisozimas, lactoperoxidasas, mucinas, transferrina e inmunoglobulina A. Estas proteínas dificultan la adhesión y crecimiento de *Candida* en la cavidad orofaríngea. Se ha demostrado que alteraciones en esta mucosa se relacionan con una mayor posibilidad de padecer candidiasis orofaríngea.²⁰

Las células epiteliales también secretan IL-8 y factores estimulantes de colonias granulocíticas como respuesta de un aumento de las colonias de *Candida* en las mucosas. Los linfocitos Th17 secretan IL-17, IL-21 y IL-22 que son importantes para el desarrollo de defensinas epiteliales y el reclutamiento de los neutrófilos.⁴⁴

Tras superar el epitelio empieza la infección invasora por *Candida*. Como primera respuesta del hospedero, el endotelio vascular secreta mediadores proinflamatorios y péptidos antimicrobianos, como las defensinas, que estimulan el reclutamiento y la activación de los leucocitos. Los neutrófilos y monocitos son las células claves en los estadios iniciales de la respuesta del hospedero frente a la infección. El tamaño de la *Candida* puede dificultar la fagocitosis del hongo por estas células de defensa por lo que el microorganismo es marcado de componentes extracelulares para marcar al patógeno y favorecer su ingestión y destrucción. Este proceso se denomina opsonización.^{17; 44}

Los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas se unen al patógeno mediante los receptores reconocedores de patrones (RRP). Estos reconocen patrones moleculares constantes en los microorganismos patógenos, estos patrones

reciben el nombre de Patrón molecular asociado a patógenos (PMAP). Los PMAP no se encuentran en las células del hospedero, son invariables entre diferentes especies y son esenciales para la supervivencia o patogenicidad del microorganismo. La activación de los RRP activa procesos característicos del sistema inmune innato, como la fagocitosis o la opsonización.²⁰ (Fig. 2)

Los RRP más importantes en el reconocimiento de *Candida spp.* por neutrófilos y monocitos son los Toll like receptors (TLR, receptores tipo toll), los receptores de manosa y la dectina-1. Hasta el momento se conocen diez tipos diferentes de TLR, los TLR más importantes en la respuesta frente a *Candida sp.* son el TLR2 y el TLR4 que reconocen dos PMAP diferentes. El PMAP que reconoce el TLR4 es el manano de la pared celular y facilita respuesta mediada por las células Th1, mientras que el TLR2 reconoce al fosfolipomanano de la pared del hongo y se asocia con la activación de la respuesta Th2. Por otro lado, los receptores de manosa permiten el reconocimiento y fagocitosis de *Candida spp.* que no ha sido opsonizada previamente. La dectina-1 se une a los beta-glucanos y actúa favoreciendo la maduración de las células dendríticas, monocitos y macrófagos así como en la activación de diferentes citocinas, en especial la IL-2 y la IL-10.^{15; 20; 44}

Como consecuencia final se activarán procesos dirigidos a producir la muerte de *Candida spp.* entre estos procesos destacan los procesos oxidativos, que incluyen la generación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, y los procesos no-oxidativos. Los factores humorales también participan en la defensa del hospedero frente a la infección por *Candida spp.* Este hongo activa el complemento por su vía clásica y alternativa.¹⁵

Las células dendríticas que hayan fagocitado *Candida spp.* en forma de blastoconidia inducirán una diferenciación de las células CD4+ a células Th1, mientras que por el contrario, las células dendríticas que captan las formas de pseudohifa inducen una respuesta Th2. La respuesta mediada por las células Th1 se asocia a una protección del hospedero frente a la infección fúngica. Por el contrario, la respuesta Th2 se relacionará con la capacidad del microorganismo de evadir o inhibir la respuesta inmunitaria del hospedero.^{15; 20; 44}

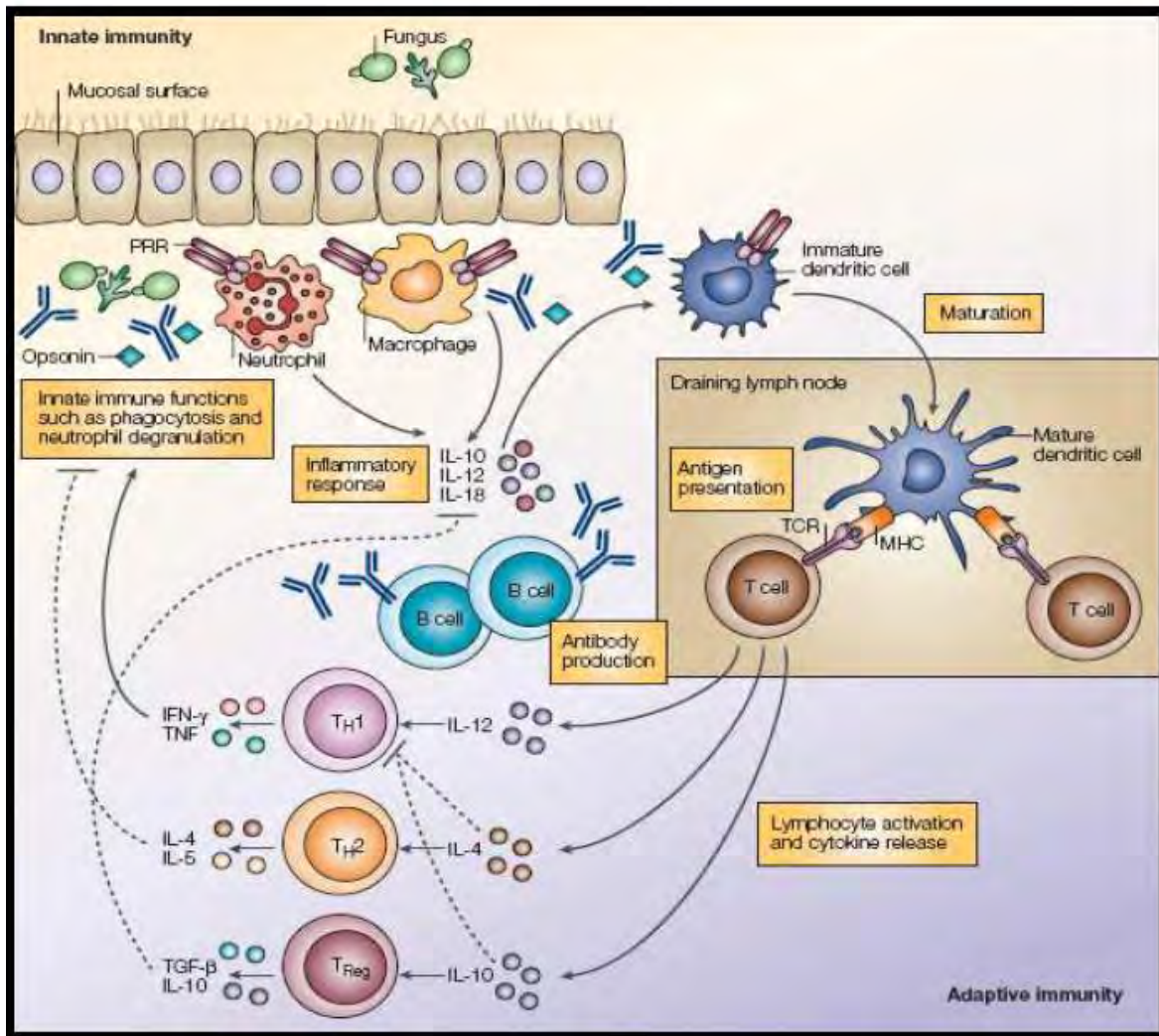


Fig. 2 Balance y protección e inmunopatología en las infecciones fúngicas. Cooperación entre la inmunidad innata y adaptativa. Luigina Roman. Nature Review. Immunology. Volumen 4. Enero 2004

TÉCNICA ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO MANANO

Desde el año 1976, en el que se publicó el primer trabajo sobre la detección de antígeno en pacientes con candidiasis invasiva, se han producido avances importantes en este campo. En general, se han desarrollado técnicas más sensibles y se ha pasado de la detección conjunta de varios antígenos a la detección de antígenos circulantes específicos e incluso epítopes específicos de esos antígenos. Sin embargo, no existe todavía una técnica aceptada universalmente.³⁵

El primero de los antígenos detectados en el diagnóstico serológico de la candidiasis invasiva fue el manano. Este antígeno es un polisacárido que se encuentra en la pared celular de la mayoría de las especies del género *Candida* de importancia médica, aunque la capacidad de detección de este antígeno en diferentes especies es variable debido a su diferente contenido en manano.^{35; 39}

La detección de manano en algunos pacientes fue posible antes de que apareciera una evidencia micológica de la candidiasis, demostrándose la transitoriedad de la mananemia en los pacientes con CI y que la antigenemia puede ser negativa para un antígeno que posea un epítipo oligomanosídico pero positiva para otro que presente una especificidad diferente, pudiendo estos antígenos presentar cinéticas diferentes y complementarias en un mismo paciente. La detección conjunta de los dos antígenos en un mismo paciente podría aumentar la sensibilidad diagnóstica al compensar la transitoriedad de la antigenemia de cada uno de los epítipos del manano.^{28; 35}

Platelia™ *Candida* Ag Plus es una técnica inmunoenzimática de tipo sándwich realizada en una etapa, sobre microplaca para la detección del antígeno manano de *Candida* en el suero o en el plasma humano. El anticuerpo monoclonal (Acm) de rata, EBCA-1 que se utiliza para sensibilizar los pocillos de la microplaca y unirse al antígeno manano, está dirigido contra los α 1-5 oligomanosídicos presentes en *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, y en menor cantidad en *C. parapsilosis* y *C. krusei*.^{19; 41}

Las muestras de suero o de plasma, se tratan con calor en presencia de EDTA para disociar los complejos inmunes y precipitar las proteínas séricas que pueden interferir finalmente con la reacción inmunoenzimática. Las muestras tratadas y el conjugado se distribuyen en los pocillos de la Microplaca sensibilizados con el anticuerpo monoclonal antimanano.¹⁹

Después de la incubación a 37°C las tiras se lavan para eliminar todo el material que no haya quedado fijado. Si hay presencia de manano circulante en la muestra humana, se forma un complejo: Ac antimanano –manano -Ac antimanano (del reactivo)/peroxidasa. La peroxidasa actúa sobre el compuesto cromógeno tetrametilbenzidina, esta reacción enzimática se detiene al añadir H₂SO₄ 1N. La lectura de la densidad óptica se efectúa con un espectrofotómetro regulado a 450/620nm. En la interpretación de resultados las muestras cuya concentración sea inferior a 62.5 pg/mL se consideran negativas, si la concentración se encuentra entre 62.5 y 125 pg/mL se consideran intermedias, cuando la concentración sea igual o superior a 125 pg/mL se considera positiva en relación con la presencia de Ag manano.¹⁹

JUSTIFICACIÓN

El Hospital Infantil de México Federico Gómez, es una Institución de atención médica de tercer nivel que recibe pacientes pediátricos con enfermedades que requieren tratamientos prolongados con antibióticos o inmunosupresores como la quimioterapia, cirugías, catéteres venosos centrales entre otros. los cuales son factores que predisponen a una infección nosocomial y defunciones secundarias a microorganismos multiresistentes y oportunistas como hongos levaduriformes del género *Candida*.

Las infecciones sistémicas causadas por *Candida* generan una morbilidad y mortalidad significativa en pacientes hospitalizados, siendo la cuarta causa de infecciones nosocomiales.

El tiempo prolongado para su diagnóstico a través de un hemocultivo, sumado a la baja sensibilidad de la prueba, hace importante la implementación de nuevas herramientas diagnósticas que permitan dirigir al médico hacia el tratamiento adecuado en el tiempo oportuno.

Actualmente hay pocos estudios que evalúen el desempeño de la técnica de detección de Ag manano de *Candida* en pacientes pediátricos mexicanos, por lo que es importante conocer cuál es el valor diagnóstico de esta prueba en estos pacientes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad clínica de la prueba inmunoenzimática de detección de antígeno manano en suero de pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

OBJETIVOS PARTICULARES

Correlacionar las pruebas diagnósticas: detección de antígeno manano, hemocultivo y el cultivo micológico y conocer las ventajas y desventajas de cada una en el proceso diagnóstico.

Evaluar los parámetros analíticos: sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, del método de análisis inmunoenzimático de detección de antígeno manano, en comparación con el estándar de oro que es el hemocultivo.

Determinar la frecuencia de las especies de *Candida*, aisladas durante el periodo de estudio.

HIPÓTESIS

La prueba de detección de antígeno de manano de *Candida* presentará un mayor desempeño analítico y un menor tiempo en la obtención de resultados comparada con los hemocultivos, contribuyendo en el diagnóstico oportuno y certero de la Candidiasis invasiva en pacientes pediátricos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Este estudio es de tipo observacional retrospectivo de una población a la cual se le realizó la prueba de detección de antígeno de manano para diagnóstico de candidiasis invasiva por un método inmunoenzimático durante el periodo de Enero del 2011 a Enero de 2013.

Población y sitios de estudio

Población

Población blanco: Pacientes entre 0 y 18 años que ingresaron al Hospital Infantil de México Federico Gómez y hospitalizados en alguno de los servicios de medicina crítica y general entre los periodos de Enero de 2011 a Enero de 2013.

Población de estudio: Pacientes de la población blanco a los cuales se les haya realizado la prueba de detección de Ag manano por su asociación de signos y síntomas sugerentes de una sepsis.

Muestra

Se obtuvieron 538 muestras procedentes de 348 pacientes hospitalizados en los servicios de medicina crítica y general del HIMFG entre el periodo de Enero del 2011 a Enero de 2013, que cumplieron con los criterios de elegibilidad definidos a continuación.

Criterios de Inclusión

- Pacientes pediátricos hospitalizados en cualquier servicio de medicina crítica o general, que presentaron signos y síntomas de una probable sepsis.
- Edad comprendida entre 0 meses y 18 años de edad
- Ambos géneros

- Con prueba de detección de Antígeno manano y hemocultivo

Criterios de Exclusión

- Pacientes que se encontraban fuera del tiempo de estudio correspondiente.
- Pacientes ambulatorios

Criterios de eliminación

- Pacientes sin hemocultivos

METODOLOGÍA

Registro de Datos

1. Registro de las bitácoras del Área de Micología del Laboratorio del HIMFG y obtención de los datos demográficos de los pacientes: nombre, registro, sexo, edad, sala de procedencia, diagnóstico de base, fecha de la prueba de Ag manano, interpretación de la prueba, hemocultivos, especie de *Candida* aislada del hemocultivo y cultivos en placa.
2. Revisión de las bitácoras de hemocultivos del área de Bacteriología de donde se obtuvieron los hemocultivos negativos de cinco días antes y después de la fecha del antígeno registrado.
3. Revisión de expedientes clínicos.

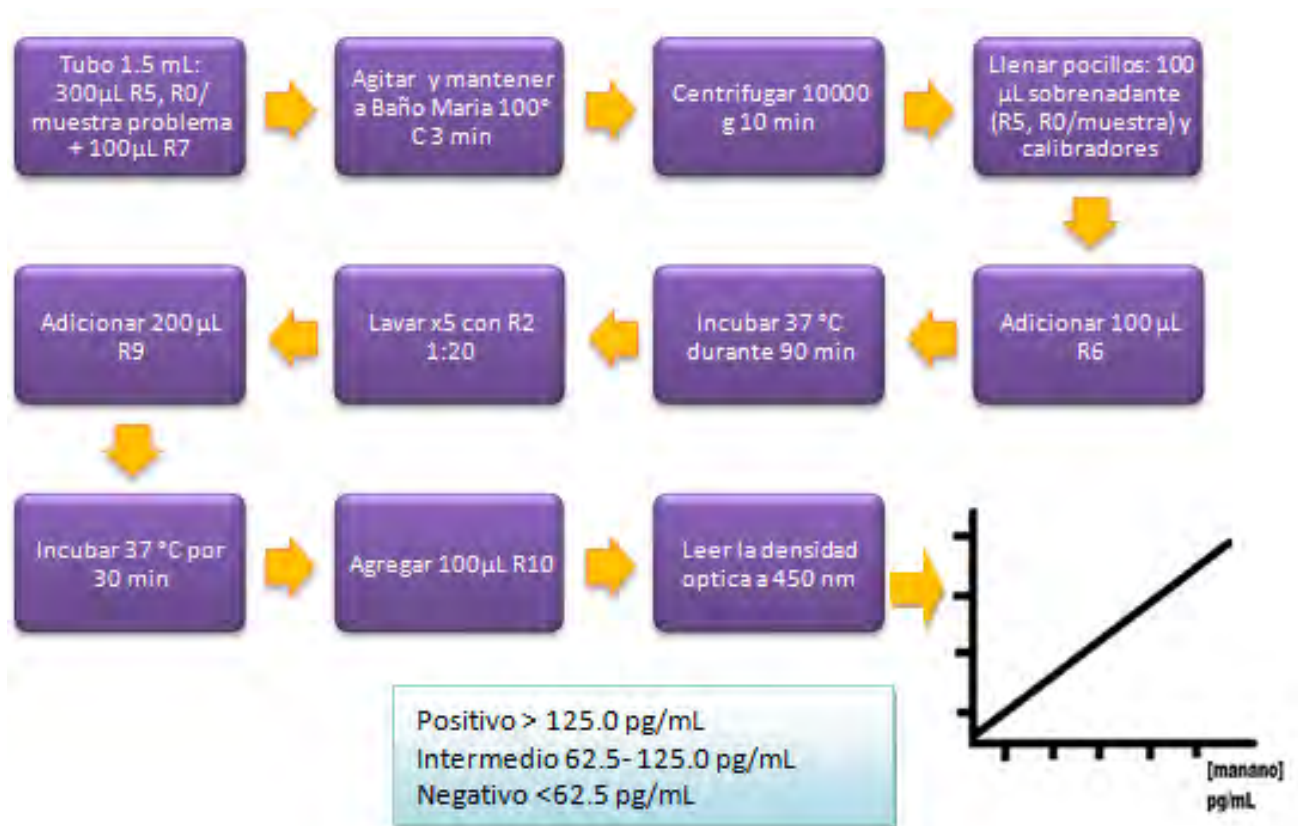
Obtención y recolección de la muestra

- 1) Recibir las muestras de sangre total en tubo Vacutainer® (tapón rojo)
- 2) Centrifugar el tubo rojo por 10 min a 1000g
- 3) Separar el suero en tubos de polipropileno
- 4) Almacenar a 2.0-8.0 °C hasta su procesamiento

Técnica

Se trabajó realizando una técnica Inmunoenzimática de tipo sándwich en microplaca comercial para la detección del antígeno manano de *Candida* en sueros humanos: PLATELIA™ CANDIDA Ag® BioRad, el procedimiento se muestra en el siguiente esquema:

Procedimiento



En la Tabla 3 se describe la función de cada uno de los reactivos de la prueba así como sus componentes:

Tabla 3. Reactivos de la prueba de captura de antígeno

REACTIVO	COMPONENTE	FUNCIÓN
R0 Control negativo	Suero Humano	Control Negativo
R1 Microplaca	96 pocillos sensibilizados con el anticuerpo monoclonal antimanano EBCA-1	Proporciona el medio para llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo
R2 Solución de Lavado	Amortiguador tris-NaCl pH 7.4 Tween 20 al 2.0%	Elimina las moléculas que no reaccionan
R3 Calibrador 0	Amortiguador Tris-NaCl con 0.0 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	Calibrador
R4a Calibrador 62.5	Amortiguador Tris-NaCl con 62.5 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	Calibrador
R4b Calibrador 125	Amortiguador Tris-NaCl con 125.0 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	Calibrador
R4c Calibrador 250	Amortiguador Tris-NaCl con 250.0 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	Calibrador
R4d Calibrador 500	Amortiguador Tris-NaCl con 500.0 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	Calibrador
R5 Control positivo	Suero Humano con manano	Control positivo
R6 Conjugado	Anticuerpo monoclonal manano antimanano marcado con peroxidasa Purpura de bromocresol	Anticuerpo que reconoce al manano y se une a el
R7 Solución de tratamiento de muestra	Solución ácida de EDTA sin conservante	Disocia complejos inmunes y precipita proteínas séricas
R9 Solución TMB Cromógeno	Solución de 3,3', 5, 5'-tetrametilbenzidina	Desarrolla un producto azul proporcional a la concentración de manano al ser oxidado por la peroxidasa
R10 Solución de parado	Solución de ácido sulfúrico 1N	Detiene la reacción

Los hemocultivos

Los hemocultivos fueron tomados por el personal médico y procesados por el Laboratorio de Bacteriología del HIMFG.

Cultivos micológicos

1. Recepción y registro de la muestra
2. Realización de Examen directo con KOH al 20%
3. Siembra de la muestra en Agar Dextrosa de Sabouraud (ADS)
4. Identificación del género y especie del microorganismo aislado

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

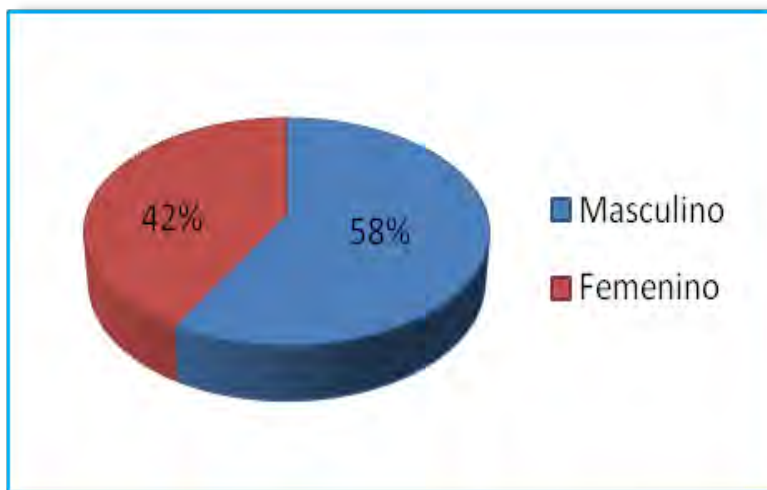
Se realizó una base de datos para el registro de los datos demográficos y clínicos de los pacientes durante el periodo de estudio. Se analizaron estadísticamente las variables mediante cuadros de contingencia. Los resultados se expresan en frecuencia y porcentaje.

RESULTADOS

Se revisaron las bitácoras de trabajo del laboratorio de Micología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de enero de 2011 a enero de 2013. De la población total del estudio (N= 561 muestras), sólo 538 muestras (procedentes de 348 pacientes) cumplieron con los criterios de inclusión establecidos. Posteriormente se procedió a revisar las bitácoras de Hemocultivos del laboratorio Bacteriología correspondientes al periodo de estudio.

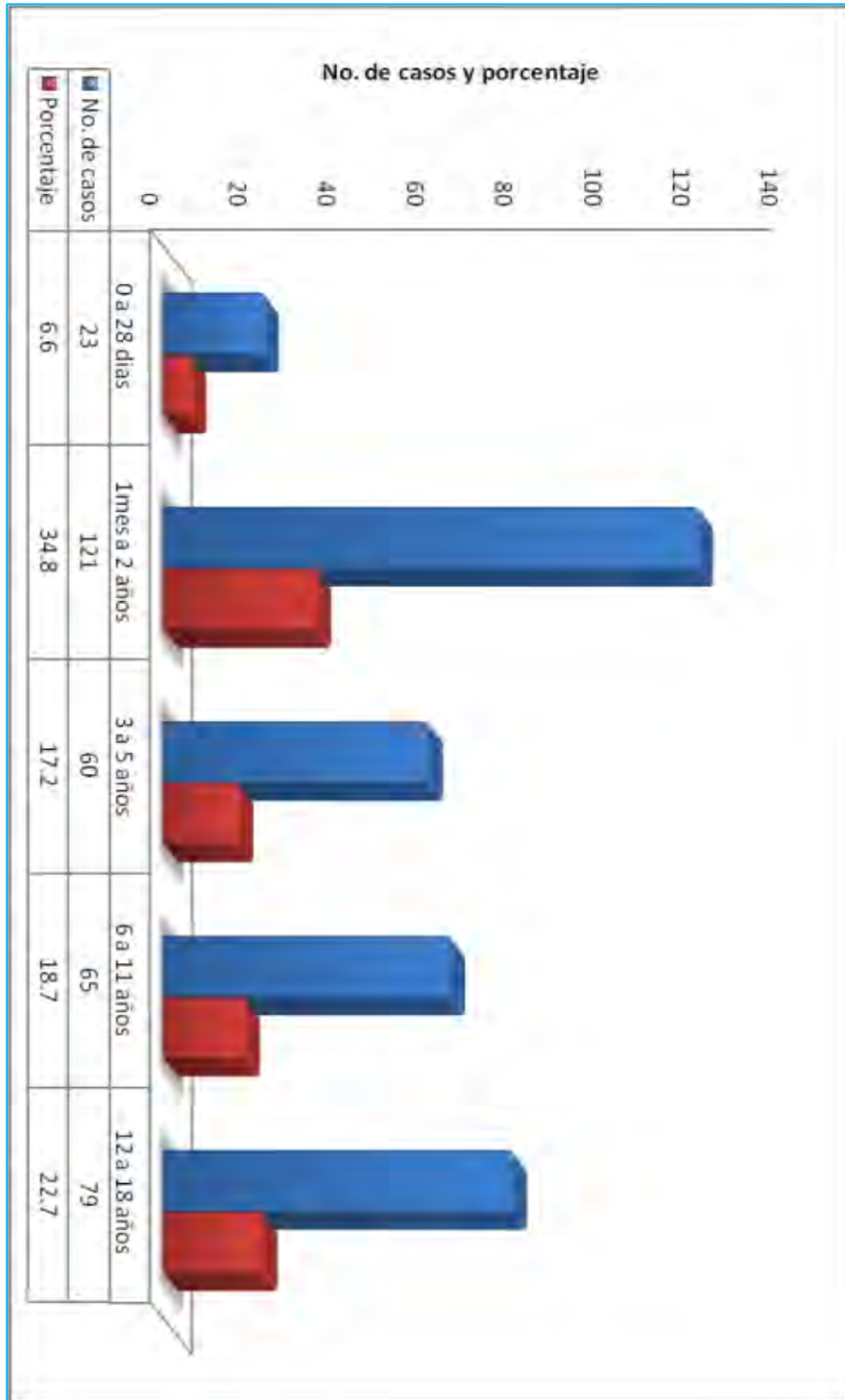
Los datos de los 348 pacientes seleccionados fueron sometidos a un análisis estadístico. De los 348 pacientes 146 (42%) correspondieron al género femenino y al 202 (58%) masculino. Gráfica 1

Gráfica 1. Distribución de los pacientes por género expresada en porcentaje.



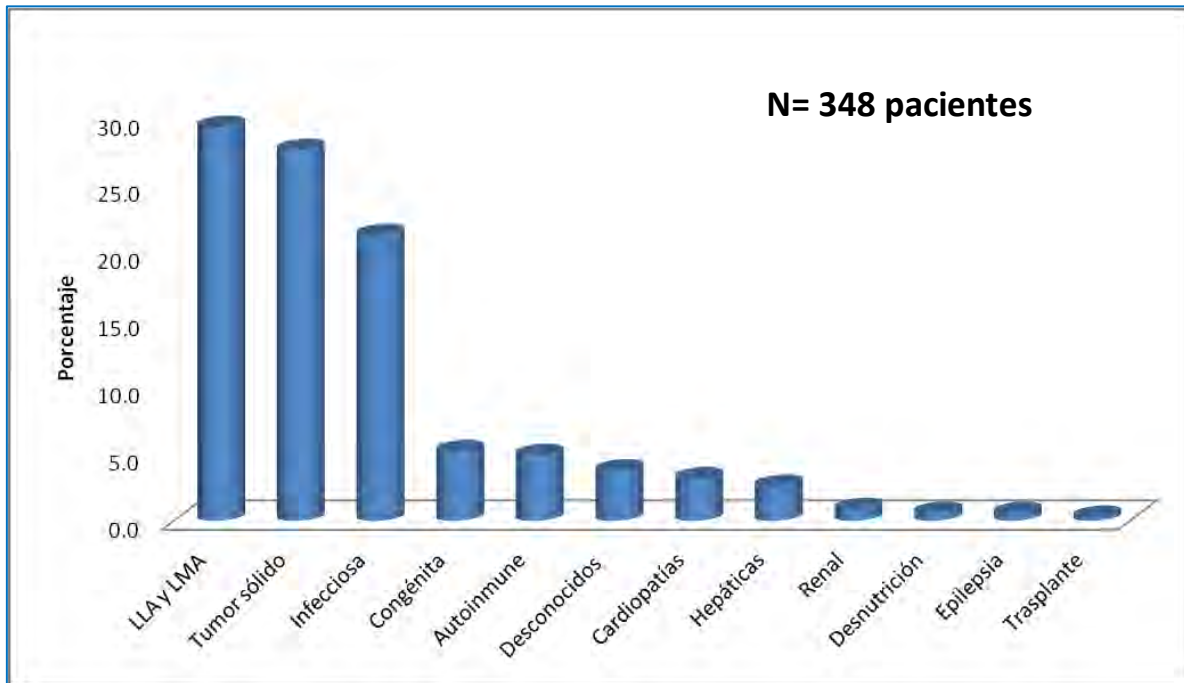
El total de la población de estudio fue dividida en cinco grupos de edad, basados en la clasificación etaria de la OMS. Las edades comprendidas fueron desde los tres días hasta los 18 años, siendo la edad más frecuente los pacientes de 1 mes a dos años (34.8%), mientras que los pacientes de 0 a 28 días, representaron el menor porcentaje (6.6%). Gráfica 2

Gráfica 2. Distribución de los grupos de Edades de los pacientes. Los resultados se expresan en Frecuencia y porcentaje



Los diagnósticos de base de los pacientes en estudio, fueron principalmente los de origen oncológico e infeccioso. La LLA y la LMA representaron el 29.3 %, los tumores sólidos el 27.6 % y los de origen infeccioso el 21.3 %. Gráfica 3

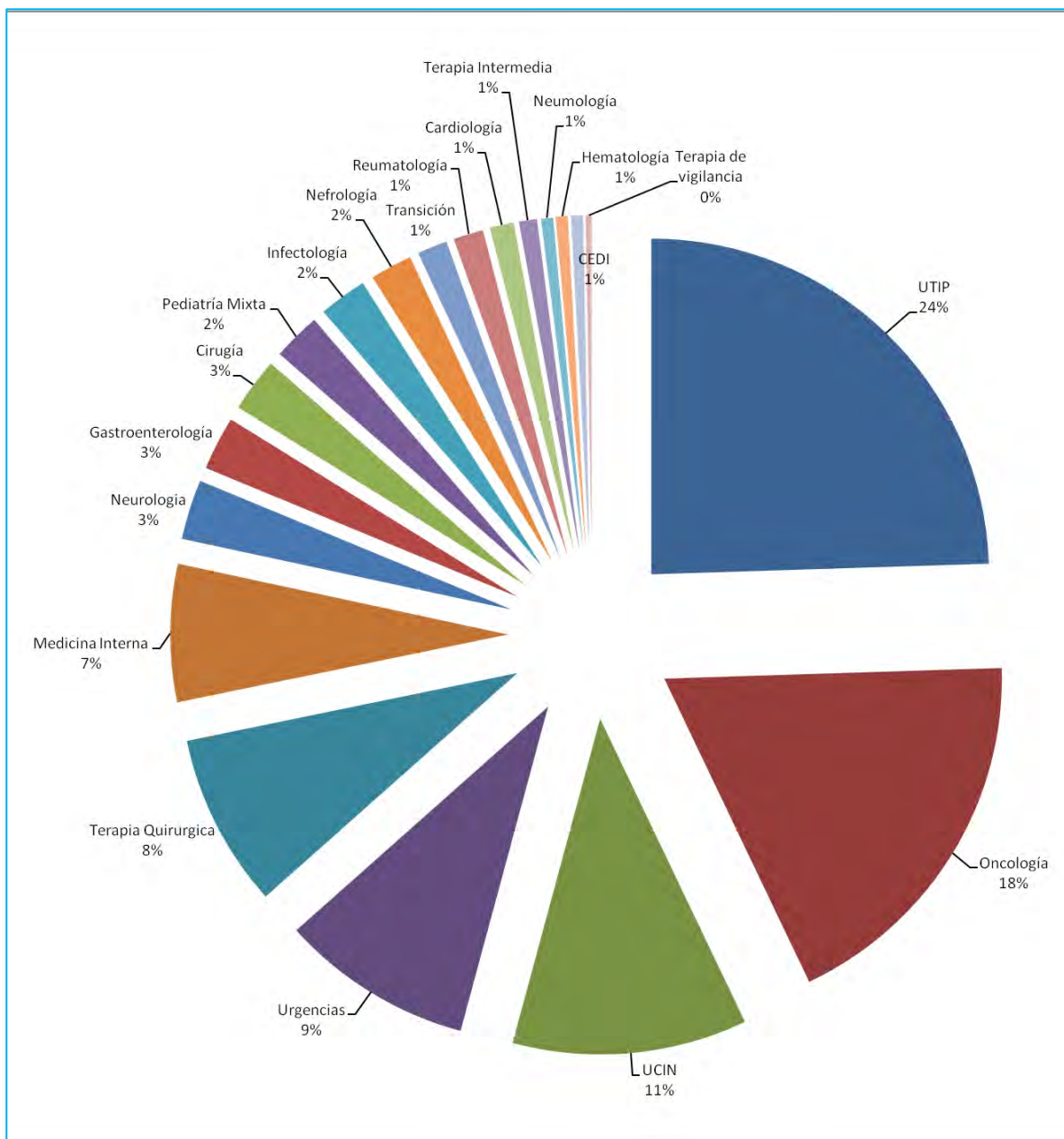
Gráfica 3. Diagnóstico de base de los pacientes



Diagnóstico	#	%
LLA y LMA	102	29.3
Tumor sólido	96	27.6
Infecciosa	74	21.3
Congénita	18	5.2
Autoinmune	17	4.9
Desconocidos	13	3.7
Cardiopatías	11	3.2
Hepáticas	9	2.6
Renal	3	0.9
Desnutrición	2	0.6
Epilepsia	2	0.6
Trasplante	1	0.3
TOTAL	348	100%

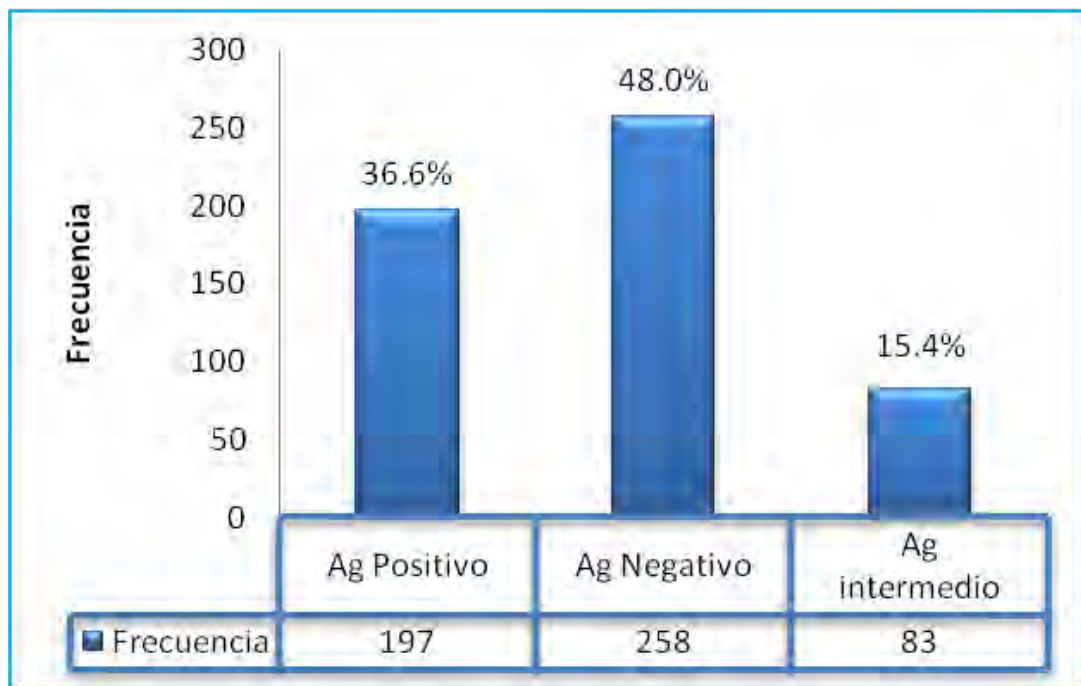
Los pacientes del estudio se encontraban en 20 diferentes salas del HIMFG. El mayor número de pacientes se encontraban internados en la UTIP (24%), seguida de la sala de Oncología (18%) y la UCIN (11%). Gráfica 4

Gráfica 4. Distribución de los pacientes por sala de Hospitalización



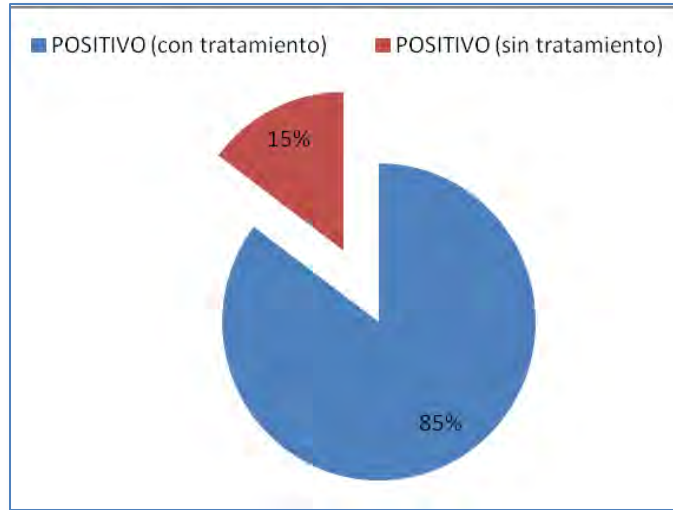
Cada una de las muestras fue sometida a la prueba de detección de antígeno manano. Los resultados de cada prueba se establecieron según los valores de corte del inserto. Las muestras con un resultado negativo para la detección del Ag, representaron el mayor porcentaje (48%), seguidas de las pruebas con resultados de Ag positivos (36.6%) y por último los resultados con Ag intermedio (15.4%). Gráfica 5.

Gráfica 5. Resultados de la captura de Antígeno manano



De los 197 resultados positivos de detección de Ag manano, 168 (85%) fueron tomados en cuenta como un dato clínico fundamental para la implementación de una terapia antimicótica, mientras que únicamente 29 de ellos (15%), no fueron clave para el inicio de la misma. Gráfica 6

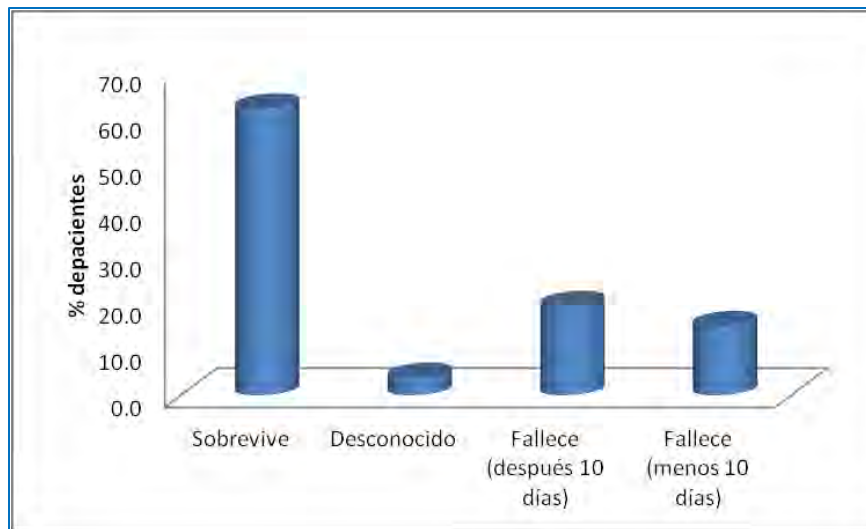
Gráfica 6. Resultados positivos reportados y tomados en cuenta para dar tratamiento antimicótico



Se realizó la revisión de expedientes clínicos para conocer la evolución médica de cada paciente del estudio. Se recabaron los datos que comprendían los 10 primeros días después de la realización de la prueba de detección de Ag manano. De los 538 pacientes totales, 216 (62.1%) sobrevivieron, mientras que 67(17.5%) fallecieron después de los 10 días y únicamente 52 (13.5) fallecieron dentro de los primeros 10 días, se desconoce la evolución médica de 13 pacientes (6.9%).

Gráfica 7

Gráfica 7. Evolución médica durante el período de estudio.



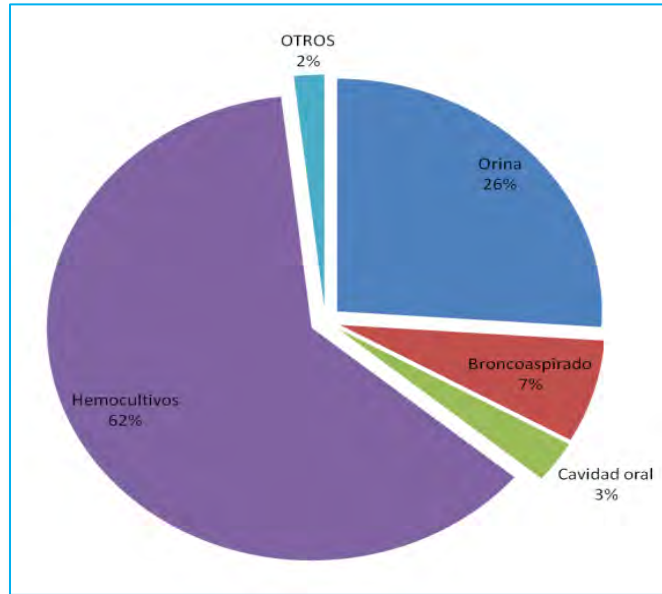
De los 538 pacientes estudiados para Ag de *Candida* a 329 se les realizó un cultivo diferente del hemocultivo. De los cuales sólo 110 (20.4%) fueron positivos (si hubo un aislamiento micológico), mientras que 219 (41%) fueron cultivos negativos. Así mismo se graficaron las 209 (39%) muestras a las cuales no se les había solicitado cultivos micológicos. Tabla I.

Tabla I. Muestras con cultivos positivos, negativos o sin cultivos (sin tomar en cuenta Hemocultivos)

CULTIVOS	#	%
Positivos	110	20.4
Negativos	219	40.7
Sin cultivo	209	38.8
TOTAL	538	100.0

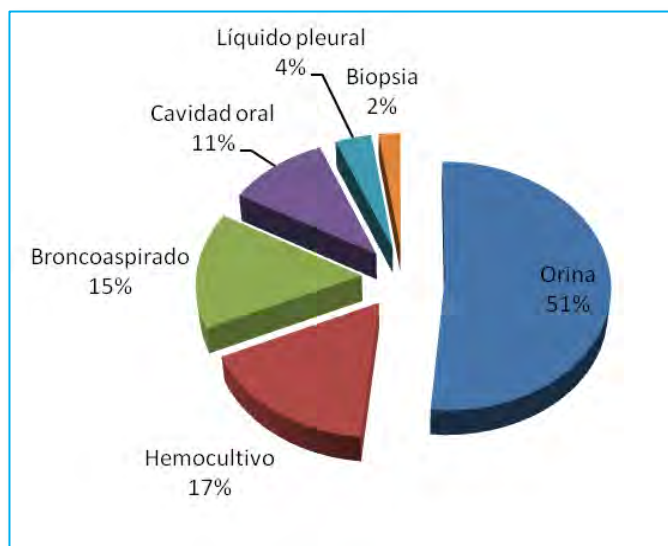
El total de datos corresponde a 867 muestras analizadas, ya que se sumaron los 538 hemocultivos de cada uno de los pacientes y los 329 cultivos micológicos que también les fueron realizados. Después de los 538 (62.1%) hemocultivos, el segundo producto biológico más analizado fue la orina, ya que se obtuvieron 226 cultivos (26.1%), seguida del broncoaspirado (7.2%), Cavidad oral (2.9%), y otros como biopsias de tejido (1.8%). Gráfica 8

Gráfica 8. Distribución total de las muestras biológicas analizadas



De las 867 muestras, sólo 132 resultaron positivas para un aislamiento de *Candida sp.*, siendo las muestras de orina las de mayor aislamiento (51.5%), seguida de los hemocultivos (16.7%) y el broncoaspirado (15.2%). Gráfica 9

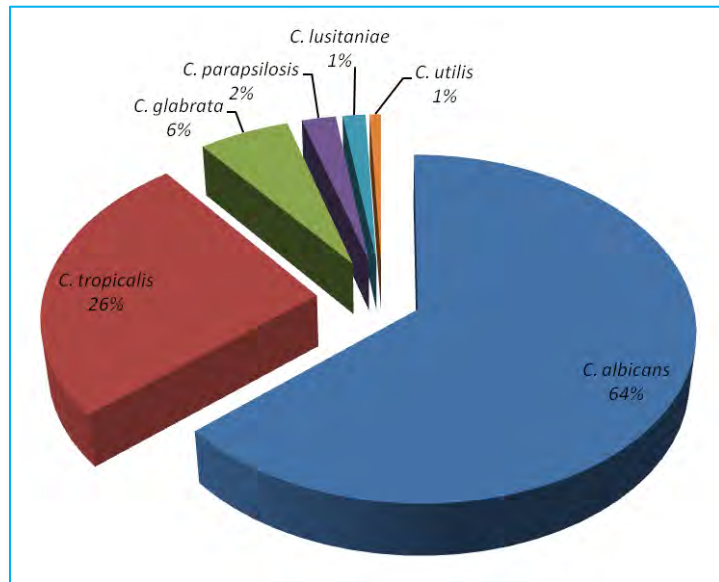
Gráfica 9. Distribución de las muestras con aislamientos positivos



La población manifestó la presencia de 6 especies de *Candida*. En los datos se encontró que la mayor parte de las cepas pertenecen a *C. albicans* (63.6%) y la menos frecuente *C. utilis* (0.8%). Gráfica 10.

Gráfica 10. Tipificación de las especies aisladas de las muestras biológicas positivas

Especie	#	%
<i>C. albicans</i>	84	63.6
<i>C. tropicalis</i>	34	25.8
<i>C. glabrata</i>	8	6.1
<i>C. parapsilosis</i>	3	2.3
<i>C. lusitaniae</i>	2	1.5
<i>C. utilis</i>	1	0.8
TOTAL	132	100.0



Se realizó la relación entre los diversos cultivos positivos con su correspondiente hemocultivo y su resultado de la detección de Antígeno (positivo, negativo, intermedio). De las 110 muestras, únicamente 15 presentaron un hemocultivo positivo y 61 obtuvieron un resultados positivo para el antígeno. Por otro lado observamos que se obtuvieron 95 hemocultivos negativos y 32 resultados de detección de antígeno negativos, mientras que 17 muestras dieron un resultado intermedio en la detección de antígeno. Tabla II.

Tabla II. Relación entre cultivos positivos, hemocultivos y Antígeno manano.

CULTIVOS	MUESTRAS	HEMOCULTIVOS		ANTÍGENO		
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Intermedio
Orina	68	9	59	39	21	8
Broncoaspirado	20	3	17	11	5	4
Cavidad oral	14	1	13	8	4	2
Otros (Biopsia, Líquido pleural)	8	2	6	3	2	3
TOTAL	110	15	95	61	32	17

Se realizó la correlación entre los 538 resultados de las pruebas de Antígeno y los cultivos realizados (no se tomaron en cuenta los hemocultivos). Gráfica 11. Posteriormente se obtuvieron los porcentajes de cada uno de los comparativos, siendo los cultivos positivos con antígenos positivos el 11.3%, cultivos negativos con antígeno negativo el 18.6%, sin embargo muchas muestras sin cultivo presentaron un resultado de antígeno negativo lo que representó el 23.4%, es importante mencionar que los porcentajes son expresados con base en los 538 pacientes (100%). Tabla III

Gráfica 11. Relación de la prueba de Ag manano con los cultivos micológicos

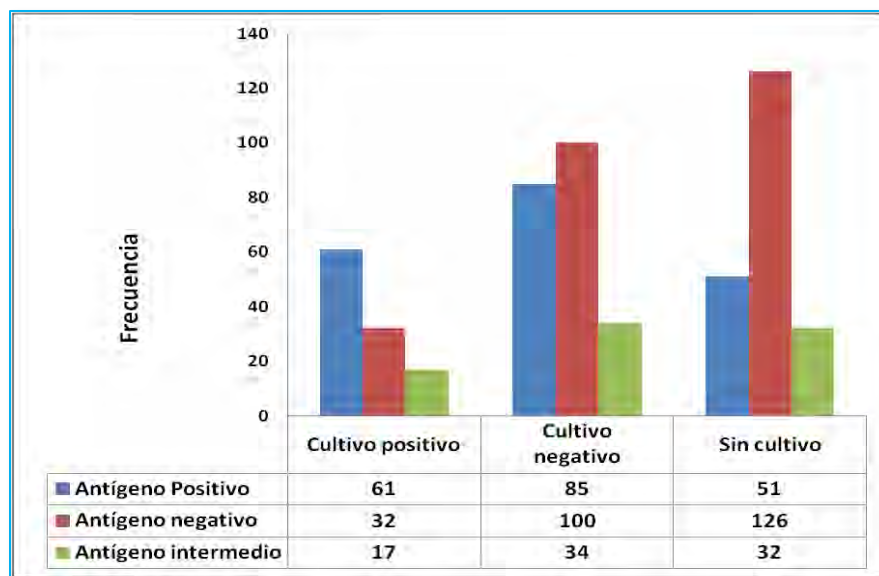


Tabla III. Porcentajes de los cultivos con relación a su resultado de la Prueba de Antígeno.

RESULTADO	# Cultivo positivo	%	# Cultivo negativo	%	# Sin cultivo	%
Antígeno Positivo	61	11.3	85	15.8	51	9.5
Antígeno negativo	32	5.9	100	18.6	126	23.4
Antígeno intermedio	17	3.2	34	6.3	32	5.9
TOTAL	110	20.4	219	40.7	209	38.8

También se correlacionaron los hemocultivos y las pruebas de detección de Ag manano. Gráfica 12. De las 538 muestras únicamente el 3.5% presentaron resultados de hemocultivo y detección de antígeno positivos, el 47.8% de las muestras correspondieron a resultados negativos para ambas pruebas. En el caso de los resultados intermedios en la detección de manano, el 15.1% correspondieron a hemocultivos negativos y sólo el 0.4%, fueron hemocultivos positivos. Tabla IV.

Gráfica 12. Relación de la Prueba de Ag manano y los hemocultivos

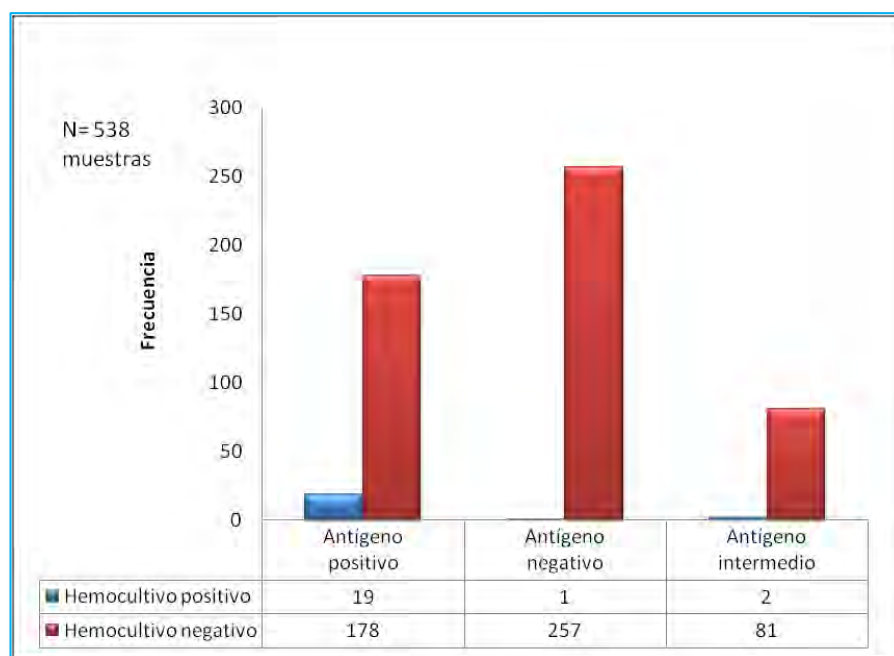


Tabla IV. Porcentajes de los hemocultivos con Relación a su resultado de la Prueba de Ag manano

	# Antígeno positivo	%	# Antígeno negativo	%	#Antígeno intermedio	%
Hemocultivo positivo	19	3.5	1	0.2	2	0.4
Hemocultivo negativo	178	33.1	257	47.8	81	15.1
TOTAL	197	36.6	258	48.0	83	15.4

Para obtener los parámetros analíticos de la prueba de detección de antígeno manano, se construyeron cuadros de contingencia y posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes. En el primero caso no se tomaron en cuenta los resultados intermedios. Tabla V y VI.

Tabla V. Datos de la prueba de captura de manano

ANTÍGENO	Pacientes enfermos	Pacientes sanos	TOTAL
Positivo	19 (VP)	178 (FP)	197
Negativo	1 (FN)	257 (VN)	258
TOTAL	20	435	455

$$S = \left[\frac{VP}{(VP + FN)} \right] \times 100 = \left[\frac{19}{19 + 1} \right] \times 100 = 95\%$$

$$E = \left[\frac{VN}{(FP + VN)} \right] \times 100 = \left[\frac{257}{178 + 257} \right] \times 100 = 59.1\%$$

$$VVP = \left[\frac{VP}{(VP + FP)} \right] \times 100 = \left[\frac{19}{19 + 178} \right] \times 100 = 9.6\%$$

$$VPN = \left[\frac{VN}{(VN + FN)} \right] \times 100 = \left[\frac{257}{257 + 1} \right] \times 100 = 99.6\%$$

Tabla VI. Características operativas de la Técnica de detección de Antígeno manano.

VARIABLE	PORCENTAJE
SENSIBILIDAD	95%
ESPECIFICIDAD	59.1%
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	9.6%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	99.6%

En el segundo caso se realizaron los mismos cálculos pero sumando los resultados intermedios de la prueba de detección de Ag manano a los resultados positivos. Tabla VII y VIII.

Tabla VII. Datos de la prueba de captura de manano sumando los Ag intermedios a los resultados positivos

ANTÍGEN O	Pacientes enfermos	Pacientes sanos	TOTAL
Ag +	21	259	280
Ag -	1	257	258
TOTAL	22	516	538

Tabla VIII. Características operativas de la Técnica de detección de Antígeno manano.

VARIABLE	PORCENTAJE
SENSIBILIDAD	8.07%
ESPECIFICIDAD	49.8%
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	7.5%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	99.6%

Por último los resultados intermedios se sumaron a los resultados negativos de la detección de antígeno manano y se calcularon los parámetros operativos. Tabla IX y X.

Tabla IX. Datos de la prueba de captura de manano sumando los Ag intermedios a los resultados negativos

ANTÍGEN O	Pacientes enfermos	Pacientes sanos	TOTAL
Ag +	19	178	197
Ag -	3	338	341
TOTAL	22	516	538

Tabla X. Características operativas de la Técnica de detección de Antígeno manano.

VARIABLE	PORCENTAJE
SENSIBILIDAD	86.36%
ESPECIFICIDAD	65.5%
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	9.6%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	99.12%

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las infecciones fúngicas son cada vez más frecuentes, los estudios epidemiológicos demuestran que la incidencia de este tipo de procesos patológicos ha experimentado un aumento, el cual puede explicarse por una serie de factores entre los que destacan el mayor número de enfermos con alteraciones del sistema inmunitario.

El Hospital Infantil de México Federico Gómez es un centro hospitalario de 3er nivel donde se atienden niños que por sus patologías de base están expuestos a factores de riesgo para el desarrollo de una Candidiasis invasiva.

En el presente estudio se incluyeron un total de 538 muestras procedentes de 348 pacientes pediátricos: 202 del género masculino (58%) y del femenino 146 (42%) (Gráfica 1). No se observó una diferencia en la proporción entre ambos datos.

La edad de los pacientes estuvo comprendida desde los tres días hasta los 18 años. Las edades fueron ordenadas de acuerdo con la clasificación etaria de la OMS¹³. Siendo los pacientes más frecuentes los niños lactantes y de corta edad (1 mes a dos años) con un 34.8%, seguidos por pacientes adolescentes (12 a 18 años) con un 22.7%, los de edad escolar (6 a 11 años) con un 18.7%, pacientes pre-escolares (de 3 a 5 años) con un 17.2% y sólo un 6.6% de los pacientes eran nacidos a término (0 a 28 días) (Gráfica 2).

Basados en nuestros resultados podemos ver que los diagnósticos de base más frecuentes fueron los de origen onco-hematológico: LLA, LMA y tumores sólidos con un 29.3% y 27.6% respectivamente. En tercer lugar (21.3%) las enfermedades infecciosas (meningitis, endocarditis bacteriana) y finalmente en menor proporción enfermedades congénitas, autoinmunes, hepáticas, renales, desnutrición, epilepsia y sólo un paciente con un procedimiento de trasplante. (Gráfica 3). Las patologías oncológicas, el uso de quimioterapia, enfermedades del sistema inmune como inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes, disminuyen la respuesta inmune celular (en especial fagocitos, células del sistema inmune de

primer orden), haciendo que no se tenga una respuesta inmune capaz de detener la proliferación fúngica, desarrollándose con mayor facilidad la candidiasis invasiva.^{1; 15; 31}

Así mismo se determinó las salas de procedencia de las muestras, siendo la UTIP la que presentó un mayor número de casos (24.4%) seguida de Oncología (18.4%) y UCIN (11.2%) (Gráfica 4). La estancia hospitalaria en estas salas es un factor de riesgo para padecer una candidiasis invasiva, esto es debido a que la mayoría de los pacientes de estos servicios presentan una larga estancia hospitalaria (mayor a 10 días), aunado a su estado inmunitario, los tratamientos (antibióticos y quimioterapia) y procedimientos médicos a los que son sometidos y que juntos favorecen la adquisición de una infección nosocomial.^{1; 31}

Del total de las muestras procesadas, se observó que el 48% de las pruebas de detección de Ag manano resultaron negativas, 36.6% fueron positivas y sólo 15.4% resultaron intermedias. (Gráfica 5). Los resultados de laboratorio son una fuente de información en la cual el médico se apoya para tomar una decisión en el tratamiento adecuado para su paciente. Del porcentaje de muestras positivas el 85% de los resultados tuvieron un impacto en la decisión del médico para abordar al paciente con una terapia antimicótica, mientras que el 15% de estos, no fueron clave para el inicio de la misma (Gráfica 6), esto debido a que estos pacientes contaban con cultivos negativos y evidencias médicas que sugerían una etiología diferente. En varios estudios se ha demostrado que una terapia profiláctica con antimicóticos (sobre todo fluconazol) reduce de manera significativa la tasa de infección por *Candida sp.* y parece reducir la mortalidad de estos pacientes, sin embargo esto no significa que esté indicada en todo paciente que se encuentre en estado crítico, esto debido a su toxicidad y los efectos secundarios de los antimicóticos de mayor uso como la Anfotericina B, el aumento en el costo de la terapia, así como la aparición de cepas multiresistentes.^{1; 18}

La candidiasis invasiva tiene un efecto significativo sobre la evolución del paciente, se estima que la mortalidad atribuible a este tipo de infección es del 30 al 70%.¹⁴ Nuestro estudio reveló que el 62.1% de los pacientes fueron egresados por

mejoría, la mortalidad de los pacientes estudiados fue 17.5% (Gráfica 7). No se pudo determinar si la causa de muerte directa fue una candidiasis invasiva, debido a que en las actas de defunción no se establecía esta etiología como una causa de defunción.

Uno de los mayores problemas para el diagnóstico de la candidiasis es el aislamiento del agente etiológico, ya que los cultivos microbiológicos en medio ADS no tienen un nivel de recuperación bueno (50%) y el tiempo requerido para su aislamiento (24 a 72 hrs) es poco útil para obtener un diagnóstico oportuno²;³³. En este estudio se observó que la mayoría de los cultivos realizados (41%) no presentaban microorganismos aislados, mientras que sólo el 20.4% tuvo algún aislamiento, sin embargo es importante mencionar que 38.8% de las muestras no contaban con cultivos diferentes al hemocultivo para poder conocer el foco de la probable infección fúngica diseminada. (Tabla I)

Se analizaron un total de 867 muestras de cultivos (538 hemocultivos y 329 cultivos micológicos) durante el periodo de estudio, las muestras biológicas examinadas fueron hemocultivos (62.1%), orinas (26.1%) seguidas de broncoaspirado (7.2%) y otras muestras (Gráfica 8). De estas muestras sólo 132 presentaron un aislamiento de hongos levaduriformes, el 16.2% de los hemocultivos, orinas el 51.5% y broncoaspirados el 15.2% otras muestras representaron el 16.7%. (Gráfica 9). Al respecto se ha demostrado que los hemocultivos son positivos en menos del 50% de las muestras de pacientes con candidiasis invasiva comprobada por autopsia.¹² Así mismo, es importante mencionar que los cultivos positivos de líquidos corporales pueden ser interpretados como colonización o contaminación, sobre todo en el caso de las orinas.²

La especie con mayor número de aislamientos fue *C. albicans* con un 63.6%, lo que coincide con la bibliografía, que indica que esta especie sigue siendo el principal agente etiológico, presentando una frecuencia de hasta un 85%.⁵ En segundo lugar se tipificó *C. tropicalis* (25.8%) seguida de *C. glabrata* (6.1%) y las menos frecuentes fueron *C. parapsilosis* con un 2.3%, *C. lusitaniae* y *C. utilis* con

un 1.5% y 0.8% respectivamente (Gráfica 10). Estos resultados coinciden con los reportados por Arroyo y colaboradores (2007) quien también realizó dichos aislamientos con pacientes pediátricos.³ El aislamiento y tipificación del agente etiológico es fundamental para dar un tratamiento específico y oportuno, que puede ayudar a disminuir tiempo y costos de su estancia hospitalaria logrando así mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Las muestras con *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* tuvieron resultados positivos para la prueba de Ag manano, sin embargo una muestra con *C. parapsilosis* presentó un resultado falso negativo, lo que indica que para algunas especies la prueba no es tan específica, esto debido a su diferencia antigénica (cantidad de manano presente en la pared celular).³² Diversos autores han reportado que la técnica de manano da buenos resultados con *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa* y *C. tropicalis*⁴⁰ pero no para *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. novergensis*, y *C. parapsilosis*.⁴⁶

Se realizó la correlación de los cultivos positivos de muestras biológicas, con su respectivo hemocultivo y los resultados de la prueba de detección de Ag manano (Tabla II) en donde se puede observar que existe muy poca relación entre los resultados, ya que no todos resultan positivos, esto debido a la sensibilidad de cada técnica. La clasificación de la EORTC/MSG (Organización Europea para la investigación y el tratamiento de Cáncer y el Grupo de Estudio de Micosis) divide a la enfermedad invasiva fúngica en probada, probable y posible. Para clasificar una infección probada es suficiente el hallazgo de estructuras micóticas en sangre. Una infección probable es aquella en la existen factores de riesgo predisponentes en el hospedero, elementos clínicos sugerentes y un estudio micológico positivo pero no definitorio, como en el caso de la prueba de Antígeno manano o los cultivos micológicos de sitios no estériles (mucosas: bucal, vaginal, intestinal; piel), mientras que una infección fúngica posible es aquella en la que se cuenta con al menos uno de los siguientes criterios: factores predisponentes ó elementos clínico-radiológicos ó cultivos micológicos.⁴⁷ Es importante destacar entonces, que la recuperación de hongos en un cultivo de una muestra proveniente de sitio no

estéril o el valor positivo de una prueba de detección de Ag manano, no es suficiente para confirmar una infección fúngica invasiva. En los resultados se observa que la mayoría de los casos sugerirían una probable o posible Candidiasis invasiva, por lo que el médico debe de interpretar cada uno de los resultados y factores de riesgo del paciente para evaluar la necesidad de un tratamiento antimicótico.

Basados en la correlación realizada de las pruebas de Ag y los cultivos micológicos (sin tomar en cuenta los hemocultivos) (Gráfica 11, Tabla III) se puede observar que la técnica podría dar un resultado positivo en algunos casos de Candidosis localizada aunque en un bajo porcentaje (11.3% de muestras con cultivo y Ag positivo), esto debido a que durante una infección además de la multiplicación del microorganismo (invasión y/o colonización), simultáneamente hay destrucción de los blastoconidios, liberando fragmentos de pared (como el manano) que viajan por el torrente sanguíneo y pueden ser detectados por la prueba.²²

Sólo el 3.5% de las muestras presentaron Hemocultivo y Antígeno positivos, estos casos pueden clasificarse como Candidiasis invasiva probada (Gráfica 12, Tabla IV). Por otro lado se observa un alto número de falsos positivos (178 muestras), que puede estar relacionada con una reacción cruzada de Ag manano y moléculas como el hidroxietilalmidón, utilizado para el tratamiento de fallos circulatorios: hipovolemia, choque hemorrágico y choque séptico.¹⁹ Así mismo debe de tomarse en cuenta que en nuestro estudio la totalidad de los pacientes sólo contaba con uno o dos hemocultivos lo cual disminuye aún más, la baja sensibilidad de esta prueba (menor al 50%) además los cultivos para *Candida* pueden ser positivos en solo el 24-60% de los casos. La positividad del hemocultivo depende de varios factores como la viabilidad de los blastoconidios, el inicio previo de una terapia antifúngica y el número de blastoconidios presentes en la muestra, sin embargo, el factor más importante que determina la positividad de esta prueba es el volumen de sangre procesada, pues se ha demostrado que la probabilidad de detectar al agente causal es de menos del 65%, esto debido a que

más de la mitad de los pacientes septicémicos portan menos de un microorganismo por mL de sangre.^{2; 27; 30; 45}

Solo se encontró un resultado Falso negativo (Tabla IV, Gráfica 12), la especie aislada en este hemocultivo fue una *C. parapsilosis* que como se mencionó presenta una diferencia antigénica con otras especies de *Candida*, lo que hace que disminuya la sensibilidad de esta técnica con dichas especies.⁴⁶ Además el rompimiento de los complejos inmunes y la liberación del manano es un punto clave en la positividad de la prueba.^{36; 40}

Los resultados intermedios con hemocultivo positivo (2 muestras) pueden deberse a que el manano circulante es rápidamente clarificado, por lo que al obtener un resultado intermedio, es fundamental que se realice un muestreo frecuente para realizar su detección.^{32; 36} Los antígenos intermedios con hemocultivos negativos podrían deberse en algunos casos a la presencia de colonización en los pacientes, ya que como se mencionó anteriormente también hay desprendimiento de manano de la pared celular.²² También es importante tomar en cuenta que existe una gran amplitud de rangos entre los valores positivos, los intermedios y los negativos.⁴⁶

Para realizar la evaluación de los parámetros analíticos, los valores intermedios fueron tomados en cuenta de diferentes formas: sumados a los valores positivos de la prueba, sumados a los valores negativos y por último fueron descartados de los resultados. Sin embargo estos resultados no deberían de excluirse del estudio debido a que representan una parte considerable de nuestra muestra total y tienen un significado clínico.

Al evaluar los parámetros analíticos (mediante una prueba diagnóstica) de la Técnica de detección de Ag manano (sin tomar en cuenta los resultados intermedios) se obtuvieron las siguientes características operativas: sensibilidad del 95%, especificidad del 59.1%, VPP 9.6%, VPN determinado fue de 99.6% (Tablas V, VI). Al tomar los resultados intermedios como positivos su sensibilidad bajó hasta un 8.07%, su especificidad fue de 49.8%, el VPP del 7.5% y el VPN de 99.6%. Al tomar los resultados intermedios como negativos, la sensibilidad se

eleva hasta un 86.36%, la especificidad obtenida es de 65.5%, VPP de 9.6% y su VPP de 99.12%.

Como puede observarse la sensibilidad y la especificidad de la técnica varían considerablemente dependiendo de cómo se tomen los resultados intermedios. Por lo tanto es primordial tomar en cuenta que el diagnóstico de la candidiasis invasiva basado en la detección de un marcador biológico de una única muestra carece de sensibilidad, por lo que es necesario analizar muestras seriadas y tomar en cuenta los factores de riesgo del paciente.^{34; 35}

El VPN de la prueba es muy alto (99%) por lo que podemos utilizar esta técnica como una herramienta que auxiliaría al médico a descartar el diagnóstico de Candidiasis invasiva. Un resultado negativo de la prueba ayudaría a evaluar si un paciente en verdad necesita de un tratamiento antimicótico, tomando en cuenta la toxicidad del mismo y la posible aparición de cepas resistentes.

Por lo anterior es necesario que el médico siga el algoritmo de diagnóstico de la Candidiasis invasiva, tomando en cuenta los resultados de esta técnica, los factores de riesgo, los cultivos micológicos, el resultado del hemocultivo y el estado inmunitario del paciente. Todo esto además de disminuir la mortalidad, la estancia hospitalaria y la incidencia de esta patología, podría disminuir el costo de hospitalización por Candidemia que se ha calculado hasta en 40 mil pesos.²

CONCLUSIONES

- El uso de nuevas y mejores técnicas como las pruebas de inmunodiagnóstico ayudan a que los pacientes reciban en menor tiempo un tratamiento específico para el microorganismo causal y así mejorar la sobrevida de estos pacientes. Un resultado negativo de la prueba de detección de Ag manano ayudaría al médico a descartar la presencia de una candidiasis invasiva, esto debido a su alto VPN (99%).
- La técnica de detección de Ag manano no presenta una ventaja significativa sobre el hemocultivo, por lo que éste, sigue manteniendo sus ventajas aún con su baja sensibilidad.
- Para realizar un diagnóstico certero de candidiasis invasiva, el resultado de la prueba de detección de Ag manano no debe tomarse como dato aislado, es fundamental contar con datos clínicos, cultivos micológicos y hemocultivos.
- *C. albicans* sigue siendo el agente número uno causante de infecciones fúngicas en pacientes pediátricos. Sin embargo el incremento de especies de *Candida no albicans* debe tomarse en cuenta para el inicio de terapia antifúngica, con el fin de evitar la selección de especies resistentes, disminuir la toxicidad y el uso inadecuado de medicamentos.
- El laboratorio de micología debe de apoyar al médico en el proceso de diagnóstico de las infecciones fúngicas invasivas, disponiendo de técnicas adecuadas, rápidas y confiables, colaborando en el inicio de terapias antifúngicas apropiadas y precoces.

PERSPECTIVAS

Con este trabajo podemos confirmar que la técnica de detección de Ag manano de *Candida* es una herramienta que puede ayudar a descartar el diagnóstico de Candidiasis invasiva, sin embargo podemos complementar este trabajo realizando la comparación de nuevas pruebas con mayor sensibilidad y especificidad. Actualmente, los marcadores biológicos de interés son el manano, el β -1,3-D-glucano y el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Candida*. En el HIMFG se realizará un estudio que correlaciona las características clínico-epidemiológicas de esta patología, con estas tres técnicas, se considera que este estudio proporcionará información trascendental en el ámbito del diagnóstico de la candidiasis invasiva en pacientes pediátricos con neoplasias hematológicas.

Es importante que los médicos además de utilizar técnicas serológicas no dejen atrás la importancia que tienen los cultivos para poder diagnosticar una candidiasis invasiva. Es por esto que se recomienda realizar un nuevo estudio que comprenda el uso de examen directo, técnicas inmunológicas, cultivos, hemocultivo, tratamiento del paciente, factores de riesgo, y la sensibilidad del microorganismo aislado, además debe vigilarse de manera estricta la fase Preanalítica de las pruebas de cultivos, ya que esto ayudaría a obtener un mayor porcentaje de recuperación del agente causal.

REFERENCIAS

1. Aguado J, Ruíz I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vázquez L, Rovira M, Martín P, Moreno A, Álvarez F, León C, Madero L, Ruíz J, Cuenca M. Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras, de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) Actualización 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29(5): 345-361.
2. Argüello G. Prevalencia de Infecciones micóticas por especies de *Candida* aisladas por hemocultivo en pacientes pediátricos en una UMAE. [Tesis] México, D.F. UNAM, 2010.
3. Arroyo S, Moncada D, Arenas R, Vick F. Determinación de las especies de *Candida* en muestras respiratorias de pacientes con ventilación mecánica. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González* 2007; 8(1): 5-9.
4. Ávila C, Cashat M, Aranda E, León A, Justiniani N, Pérez L, Ávila F, Castelan M, Becerril R, Herrera E. Prevalencia de infecciones nosocomiales en niños. Encuesta en 21 hospitales en México. *Salud Pública Mex.* 1999; 41(1): 518-525.
5. Bonifaz A. Candidosis en: *Micología Médica Básica*. Mc GrawHill 2010; 279-302.
6. Camacho A, Rositas F, Ramos J. Candidemia en pacientes críticamente enfermos sin neutropenia: lo que el internista debe saber. *Med Int Mex* 2007; 23: 234- 239.
7. Cantón E, Viudes A, Peman J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 51-55.

8. Castrillon L, Palma A, Padiella C. Factores de virulencia de *Candida sp.* *Derma Rev Mex* 2005; 49: 12-27.
9. Cortés J, Concha A, Cediell L, Castillo J. Métodos diagnósticos en Candidemia una revisión sistemática de la literatura con meta-análisis. *Rev Chil Infect* 2011; 28(5): 423-428.
10. Coto G, López J, Fernández B. Candidiasis invasiva en el periodo neonatal. *Boletín médico del Hospital Central de Asturias* 1998; 1-17.
11. Coutinho H. Factors Influencing the Virulence of *Candida spp.* *West Indian Med J* 2009; 58: 160-163.
12. Ellapola A, Morrison J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Microbiol* 2005; 43: 65-84.
13. Fondo de Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). Online Suministros y logística. Revisado el 2 de julio de 2013. Disponible en http://www.unicef.org/spanish/supply/index_53571.html
14. García J, Amitio E, Ponton J. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 55-62.
15. García C, Carratalá J. Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30(3): 151-158.
16. Garey W, Beyda N, Lewis R. Echinocandin resistance in *Candida* species: Mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann Pharmacother* 2012; 46: 1086-1096.

17. Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, Cassone A. Assessment of detection of *Candida* mannoproteinemia as method to differentiate central venous catheter-related candidemia from invasive disease. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 903-906.
18. Gobierno Federal. Guía Práctica Clínica: Diagnóstico y tratamiento de Candidiasis invasiva en el Adulto. IMSS-562-12, 2012.
19. Inserto Platelia® Candida Plus (Bio-Rad®).
20. Karkowska J, Rapala M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigates*. *Acta Bioch Polo* 2009; 56: 211-224.
21. Lim Y, Rosli R, Seow H, Chong P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basic. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 21- 31.
22. López R, Méndez L, Hernández F. Actualidades de Micología médica. Sefirot, UNAM, México 2012; 30-32.
23. Márquez M, Díaz R, Fernández O, García R. Fungal (*Candida*) Infections in critically ill children in the intensive care unit. *Drugs of today* 2008; 44(4): 33-41.
24. Masuoka J. Surface Glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses and experimental challenges. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 281-310.
25. Mayer F, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanism. *Virulence* 2013; 4: 119-128.

26. Medina M, Hernández I, Nandí M, Ávila C. Infecciones nosocomiales en una unidad de cuidados intensivos neonatales. *Perinatol Reprod Hum* 2000; 14: 143-150.
27. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, *Microbiología Médica*. Elsevier, España, 2009; 189-191.
28. Mokaddas E, Burhamah M, Khan Z, Ahmad S. Levels of (1→3)-β-D-glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA in serum samples of pediatric cancer patients colonized with *Candida* species. *BMC Infectious Diseases* 2010; 10:292-297.
29. Olivieri S, Trovato L, Betta P, Romeo M, Nicoletti G. Experience with the Platelia *Candida* ELISA for the diagnosis of invasive Candidosis in neonatal patients. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 391-393.
30. Ortíz F, Olivia J, Figueroa J, Soriano D. Evaluación controlada del volumen de sangre necesario para la detección de bacteremia o funguemia en recién nacidos. *Rev Enf Infec en Pediat* 2005; 18(73): 3-7.
31. Pappas P, Kauffman C, Andes D, Benjamin D, Clandra T, Edwards J, Filler S, Fisher J, Kullberg B, Ostrosky L, Reboli A, Rex J, Walsh T, Sobel J. Clinical Practice Guidelines for the management of candidiasis: 2009. Update by the infectious Diseases Society of America. *Treatment Guidelines for Candidiasis* 2009; 48: 503-534.
32. Pasqualotto A, Denning D. Diagnosis of invasive Fungal Infections –Current imitations of classical and new diagnosis methods. *European Onco Rev* 2005; 1: 1-9.
33. Peman J, Zaragoza R. Hacia el diagnóstico temprano de la Candidiasis invasora en el paciente crítico. *Rev Iberoam Micol* 2012; 29(2): 71-75.

34. Ponton J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 25-29.
35. Pontón J. Microbiological non-culture methods for the diagnosis of invasive candidiasis: usefulness of surrogate markers. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 20-25.
36. Quindos G, Moragues M, Ponton J. The role of antigen and antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis . Mikol Lek 2004; 11(2):145-151.
37. Reséndiz J, Morales J. Factores Asociados a mortalidad por funguemias causadas por *Candida sp.* en niños. Boletín Médico del Hospital Infantil de México 2007; 64: 91-98.
38. Roing T. Infection caused by *Candida* species during the neonatal intensive care. Rev Cub Ped 2008; 3: 1-13.
39. Ruíz J, Elorza M, Valentin E, Sentandrev R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. FEMS Yest Res 2005; 6: 14-29.
40. Sendid B, Poirots J, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D, Poulain D. Combined detection of mannanemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. J Med Microbiol 2002; 51: 433-442.
41. Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M, Poulain D. Increased sensitivity of mannanemia detection test by joint detection of α - and β - linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. J Clin Microbiol 2004; 42: 164-171.

42. Vázquez O, Gutierrez P, Campos T, Martínez I, Romero R, Echeverría G, García G. Detección de Antígeno manano de *Candida* en suero mediante anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de candidiasis aguda diseminada. Rev Mex Patol Clin 2002; 49(4): 221-228.
43. Yeo S, Wong B. Current status of non-culture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 465-484.
44. Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. Eur J Immunol 2007; 37: 2695-2706.
45. Benjamin K, Garges H, Steinbach WJ. *Candida* bloodstream infection in neonates. Semin Perinatol 2003; 27:375-83.
46. Ellis M, Al-Ramadi B, Bernsen R, Kristensen J, Alizadeh H, Hedstrom U. Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of Invasive *Candida* infections in patients with neutropenic fever. J Med Microbiol 2009; 58: 606-615.
47. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas P, Maertens J, Lortholary O, Kauffman C, Denning D, Patterson T, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes W, Herbrecht R, Hope W, Kibbler C, Kullberg B, Marr K, Muñoz O, Odds F, Perfect J, Restrepo A, Ruhnke M, Segal B, Sobel J, Sorrell T, Viscoli C, Wingard J, Zaoutis T, Bennett J. Revised definitions of invasive fungal disease from European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46: 1813-21.
48. Llovo J, Pontón J. Diagnóstico Microscópico de las micosis. Rev Iberoam Micol 2007; 14a: 1-16.