



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

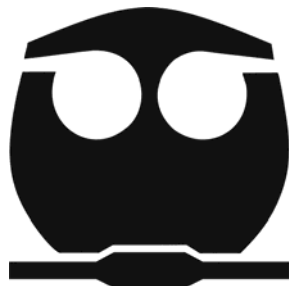
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PRUEBAS SEROLÓGICAS Y CULTIVOS
EN EL DIAGNÓSTICO OPORTUNO DE CANDIDOSIS SISTÉMICA
EN PACIENTES DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**TESINA QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
PRESENTA:**

QFB MARÍA JOSÉ GUTIÉRREZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Luis Manuel Perea Mejía
Vocal	Dr. José Pérez Jáuregui
Secretario	Dr. Rodolfo Pastelín Palacios
1er. Suplente	M. en C. Guadalupe Ortiz Gómez
2do. Suplente	M. en C. Isela Montúfar Robles

Trabajo realizado en el Laboratorio de Micología del Laboratorio Central del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Asesor del tema:

Dra. Rosamaría Bernal Redondo

Sustentante:

QFB María José Gutiérrez Martínez

Gracias...

Dra. Briceida López Martínez, por permitir la realización de ésta tesina en el Laboratorio Central y otorgar las facilidades necesarias para llevarla a cabo.

Dra. Rosamaría Bernal Redondo, por la oportunidad que me brindó de ser parte de su equipo, la confianza y el apoyo durante este tiempo.

QFB Marcela Jiménez Jiménez y Biól. Exp. Celedonio Ramírez Guerrero, por la gran ayuda que fueron en éste trabajo, sus conocimientos compartidos y sobre todo por su amistad que me regalaron.

Gracias...

Dios, por ser mi fortaleza.

Mis Ángeles, por ser mi luz.

UNAM, por ser mi origen.

Mamá, Papá y Hermano, por su amor incondicional y por ser mi soporte y mi razón de cada día.

QFB Alexandro Bonifaz, por seguir siendo un apoyo y porque la enseñanza de vida continúa.

Anaid, Beatriz y Liliana, por la amistad que hemos mantenido, con todo lo que implica ésta palabra.

Alma, Ángel, Dennise, Javier, Marco, Margarita y Teresa, por su amistad y su forma tan particular de demostrarme su cariño.

Alberto, Ana, César, David, Graciela, Hugo, Javier, Luis, María José, Ricardo y Teresa, por enseñarme lo que es el compañerismo.

Gracias a todos por las risas y los momentos compartidos.

Abreviaturas

°C	grados Celsius	li	linfopenia
?	dato desconocido	m	meses
a	años	µL	microlitros
Ab	anticuerpo	mL	mililitros
Ag	antígeno	min	minutos
an	antifúngico	N	concentración normal
C.	<i>Candida</i>	NK	natural killer
et al.	y colaboradores	nm	nanometros
FN	falso negativo	ne	neutropenia
FP	falso positivo	Pe	proporción de concordancia esperada
HSP	proteína de choque térmico	pg	picogramos
ig	inmunoglobulina	Po	proporción de concordancia observada
IL	interleucina	sp	especies
in	inmunosupresor	Th	linfocitos T ayudadores
INF	interferón	TNF	factor de necrosis tumoral
g	gravedades	UA	unidades arbitrarias
K	índice Kappa	UDO	unidades de densidad óptica
LES	lupus eritematoso sistémico	VN	verdadero negativo
LLA	leucemia linfoide aguda	VP	verdadero positivo
LMA	leucemia mieloide aguda		
le	leucopenia		

Índice

Resumen.....	2
Introducción	3
Justificación	11
Objetivos e hipótesis	12
Material y métodos	13
Resultados	19
Discusión de resultados	32
Conclusiones	44
Bibliografía	45

Resumen

La candidemia es un problema de salud a nivel nosocomial por lo cuál es importante contar con herramientas en el laboratorio clínico para dar un resultado certero y oportuno. Tal es el caso de las pruebas serológicas, entre las que se encuentran los estuches comerciales Platelia[®] *Candida* Plus (Bio-Rad[®]) que detectan antígeno manano y anticuerpo anti-manano para el diagnóstico de candidosis sistémica.

Se muestran los resultados de la comparación entre las pruebas serológicas para manano y anti-manano y cultivos de muestras biológicas de pacientes pediátricos con diferentes enfermedades, para comprobar la eficacia diagnóstica de las técnicas.

De junio a noviembre de 2011 se recolectaron 84 muestras de suero de 62 pacientes, 39 del sexo masculino y 23 del femenino, con edades desde 3 días hasta 18 años. Treinta y ocho pruebas de antígeno fueron positivas y 22 de anticuerpo. Sólo ocho casos tuvieron hemocultivo positivo, los cuáles coincidieron al menos en una de las dos pruebas, confirmando la candidosis sistémica. Los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) para las pruebas fueron los siguientes: para la captura de manano S: 75.0 % y E: 70.0 %, para la detección de anti-manano S: 31.2 % y E: 67.5 % y para las pruebas combinadas S: 53.1 % y E: 68.7 %.

Estas pruebas no son específicas para candidosis sistémica, también indican la presencia de una candidosis local, por lo que se tienen que trabajar conjuntamente con las técnicas convencionales para tener un diagnóstico más certero.

Introducción

La candidosis es una micosis cosmopolita causada por levaduras oportunistas del género *Candida*, teniendo como especies más comunes a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Su vía de entrada es endógena por ser parte de la flora habitual del humano, se presenta en todas las edades y en hombres y mujeres por igual [Bonifaz, 2010].

Entre los diversos tipos de candidosis, la invasiva es una complicación que se presenta principalmente en pacientes hematológicos que persisten febriles y neutropénicos [Ellis et al., 2009; Fujita et al., 1992; Lemieux et al., 1990]. La incidencia de esta enfermedad ha ido en aumento en la última década, convirtiéndose en una importante causa de morbilidad y mortalidad en diferentes tipos de pacientes inmunocomprometidos: 20.0–30.0 % con leucemia, 50.0 % neutropénicos con quimioterapia por leucemia o trasplante de médula ósea y 12.0 % con linfoma [Denning et al., 1997; López et al., 2004; Reboli, 1993].

Los factores de riesgo de la candidosis invasiva son: inmunocompromiso, terapia inmunosupresora, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, neutropenia, alta colonización en mucosas con rompimiento de la barrera, quimioterapia, uso de antibióticos de amplio espectro, presencia de catéter y prótesis, alimentación parenteral, tumores sólidos, quemaduras y neonatos de bajo peso [Fujita et al., 1992; Jones, 1990; Masouka, 2004; Phillips et al., 1990; Reboli, 1993; Sendid et al., 2003].

El diagnóstico preciso y oportuno de la candidosis invasiva ha sido difícil porque los signos y síntomas son inespecíficos y por la naturaleza comensal de estos patógenos oportunistas, lo que retrasa el inicio de la terapia antifúngica y contribuye a la alta morbilidad y mortalidad de estos pacientes [Fah Yeo et al., 2002; Fujita et al., 2006; Gutiérrez et al., 1993].

La confirmación de la candidosis sistémica es a base de la histopatología y hemocultivos. El uso de técnicas histopatológicas no es permitido por la condición crítica de los pacientes y los cultivos normalmente son negativos o se vuelven positivos muy tarde, mientras que en pacientes con catéter o colonizados son positivos [Fah Yeo et al., 2002; Gutiérrez et al., 1993; Mitsutake et al., 1996; Paulovicová et al., 2008]. Además la sensibilidad de los cultivos es muy baja, reportando valores de 35.0–50.0 %, aún si se realizan diariamente [Lemieux et al., 1990; Martínez et al., 1998; Masouka, 2004; Rimek et al., 2003; Sendid et al., 2003; Yera et al., 2001; Zöller et al., 1991].

El tratamiento de la candidosis sistémica es a base de anfotericina B y se inicia dentro de las primeras 24 horas, una vez que el hemocultivo resulta positivo. Esta indicación mejora el pronóstico, ya que el retraso incluso de un día aumenta significativamente la mortalidad [Bougnoux et al., 1990; Wheat, 2009]; también se usa como terapia empírica pero sólo para pacientes con alto riesgo (inmunocomprometidos con fiebre de origen desconocido con cobertura antibacteriana de amplio espectro), ya que los expone a toxicidad, aumenta la probabilidad de resistencia y sólo del 10.0–20.0 % de éstos desarrollan la

enfermedad [De Bernardis et al., 1993; Han et al., 1999; Morhart et al., 1994; Paulovicová et al., 2008; Reboli, 1993].

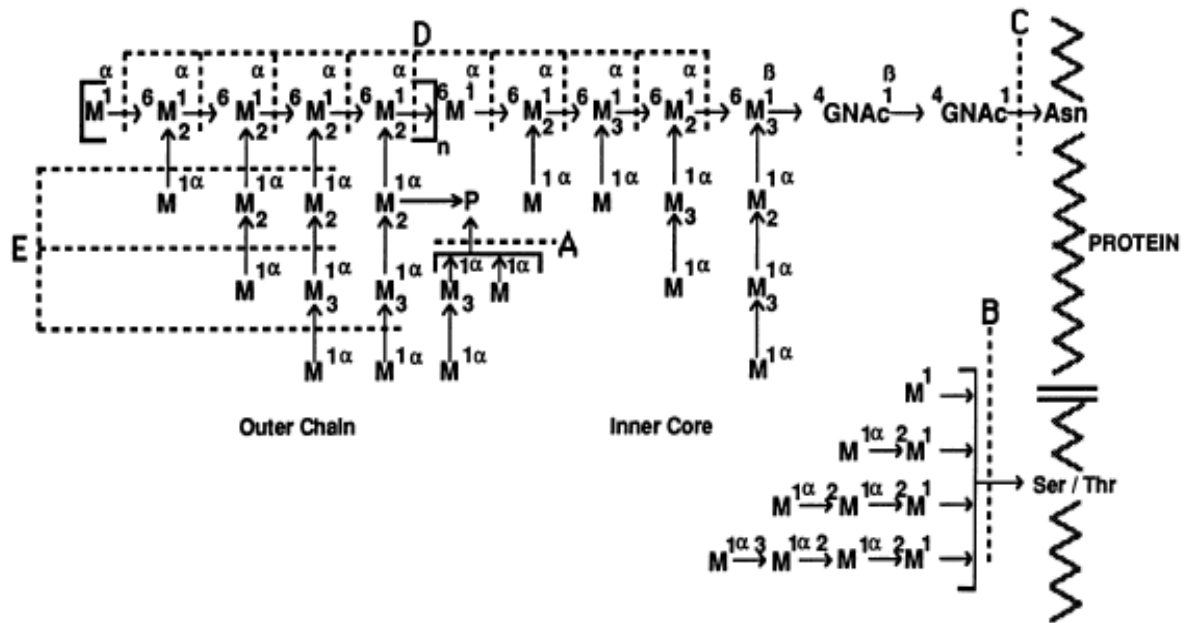
Por todas estas causas, desde 1976 varios investigadores han reportado los intentos de desarrollar inmunoensayos para la detección de *C. albicans* en suero de pacientes infectados [Jones, 1990]. Técnicas de diagnóstico independientes del cultivo, más rápidas y efectivas como los métodos serológicos de detección de anticuerpos contra *Candida* sp, proteínas (enolasa, HSP 90s), metabolitos (D-arabinitol), DNA y polisacáridos (1→3-β-D-glucano, manano) [Bougnoux et al., 1990; Fujita et al., 1992; Quindós et al., 2004; Sendid et al., 1999].

En la exploración de las mejores moléculas a utilizar en los métodos serológicos se buscan los marcadores antigénicos ideales, los cuáles deben tener las siguientes características: no estar presentes transitoriamente, asociados a la infección y no a la colonización, conservados dentro de las especies de los hongos de interés, presentes en todas las cepas en diferentes condiciones de crecimiento, no tener reacción cruzada con otros antígenos, desencadenar respuesta inmune preferentemente en estadios tempranos y no inducir respuesta inmune importante durante su relación con el hospedero como parte de la flora [Fah Yeo et al., 2002; Martínez et al., 1998].

En general, las moléculas utilizadas se enfocan en los componentes de la pared celular y principalmente a la captura del manano. La pared celular mantiene la integridad de la célula e interacciona con el ambiente, tiene función nutricional, además que es el blanco de los anticuerpos y el sitio donde las funciones biológicas relacionadas con la patogenicidad y virulencia se llevan a cabo, ya que media la

interacción hongo–huésped, por lo que es una fuente importante de antígenos [Chaffin, 2008; López et al., 2004]. Sus principales componentes son carbohidratos (80.0–90.0 %): mananos (manoproteínas), glucanos y quitina [Martínez et al., 1998]. El término manano se usa para referirse al principal componente soluble de la pared [López et al., 2004]. Los mananos o polímeros de manosa representan el 40.0 % del total de los carbohidratos y constituyen el 7.0 % de peso seco de la levadura [Ellis et al., 2009; White et al., 2005]. Por su estructura también se llama fosfomanoproteína o fosfopeptidomano, una glicoproteína compuesta por residuos de manosa unidos por enlaces α -1,6, que se fijan a la porción de la proteína a través de dos residuos de N-acetil-D-glucosamina (β -1,4) y un residuo de asparagina. Además otros residuos de manosa que se unen a la proteína por una serina y una treonina [Masouka, 2004; Nelson et al., 1991; Poulain et al., 2004].

Figura de la representación esquemática de la estructura de manano (Nelson et al., 1991).



El manano es liberado de la pared celular durante la infección y circula en el torrente sanguíneo, participa en la virulencia al tener una propiedad inmunosupresiva que juega un papel en la persistencia del hongo y estimula o suprime la respuesta inmune, por lo que es considerado antígeno y factor de virulencia. Su composición varía entre especies y cepas, así como entre pseudohifas y blastoconidias de una misma cepa. Esta variación se da entre el número de residuos unidos, el número de enlaces y el lado de unión del fosfato. También se ha relacionado con la variabilidad antigénica y con la diferencia entre cepas patógenas y no patógenas [Faille et al., 1992; Martínez et al., 1998; Rimek et al., 2003; Sendid et al., 2004].

La captura de manano por inmunodiagnóstico fue sugerida por primera vez por Wiener y Coats–Stephen en 1979 y la primera prueba comercial Cand–Tec® estuvo disponible en 1989 como una técnica de aglutinación. La detección de anti–manano fue propuesta por Akiba, Iwata e Inouye en 1957 y el estuche Pastorex *Candida*®, también una técnica de aglutinación, comercializado desde 1993. Posteriormente se desarrollaron las técnicas de ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) incrementando 10 veces la sensibilidad [Fah Yeo et al., 2002; Fujita et al., 2006; Sendid et al., 1999; Sendid et al., 2002; Takazono et al., 2011].

Una de las técnicas de captura de antígeno manano y detección de anticuerpos anti–manano se realiza por medio de ELISA con estuches Platelia® *Candida* Plus (Bio–Rad®) que se comercializaron en 1998 [Inserto Bio–Rad®]:

- Platelia® *Candida* Ag Plus (Bio–Rad®): ensayo inmunoenzimático tipo sándwich para detectar al antígeno circulante manano de *Candida* sp en suero, por medio de anticuerpos monoclonales de rata EBCA–1 (adheridos a

los pocillos de las microplacas) dirigidos contra los enlaces α -1,5-oligomanosídicos de *Candida* sp. Detectados a su vez por anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa, que desarrolla un producto amarillo al adicionar tetrametilbenzidina como cromógeno.

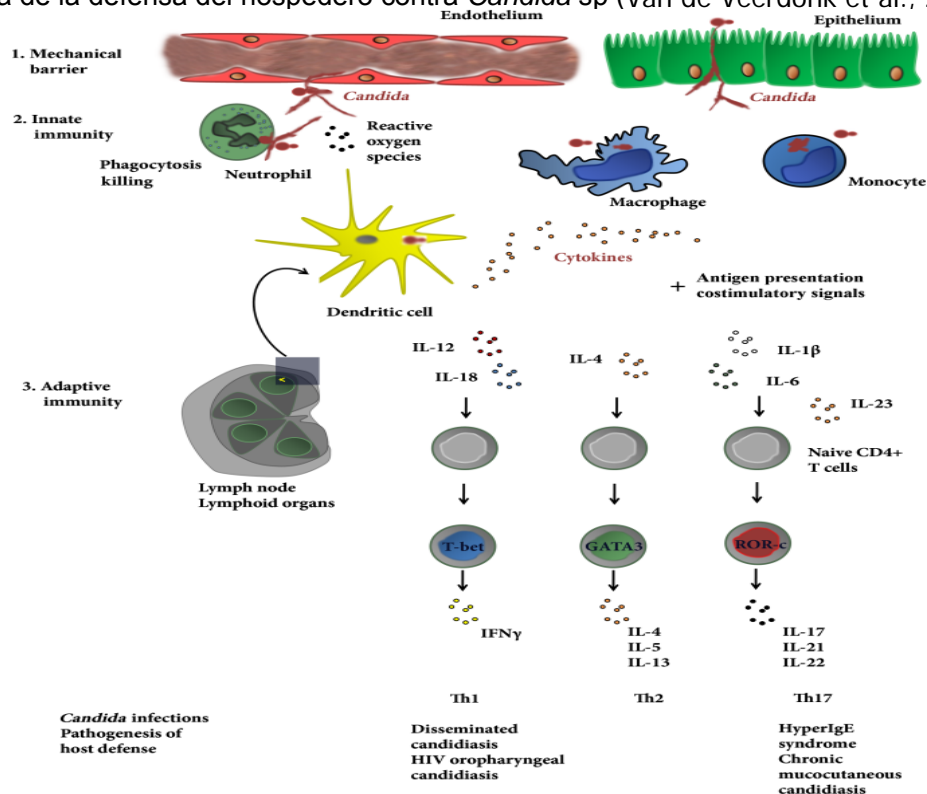
- Platelia[®] *Candida* Ab Plus (Bio-Rad[®]): ensayo inmunoenzimático indirecto que detecta anticuerpos anti-manano en suero uniéndose a antígenos manano de *C. albicans* (sensibilizando a los pocillos), que son también reconocidos por anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG/IgA/IgM humano marcados con peroxidasa y desarrolla el producto amarillo usando el mismo cromógeno.

La defensa del sistema inmune contra *Candida* sp depende de las barreras de la piel y mucosas, además de un reconocimiento adecuado del hongo para desencadenar los mecanismos de defensa innatos y adaptativos. La primera línea de defensa es la piel y mucosas, que no sólo es una barrera mecánica sino también provee antagonismo microbiano con su flora asociada. Una vez que la primer línea de defensa falla, los mecanismos innatos se activan si hay un reconocimiento apropiado del patógeno, mediado por receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) que se unen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's), los más conocidos y estudiados son componentes de la pared celular. Dos tipos de PRR's participan en el reconocimiento de *Candida* sp: receptores tipo Toll (TLR's) como TLR2 (reconoce glucanos) y TLR4 (reconoce proteínas de choque térmico) y receptores de lectina tipo-C (lectina dependiente de calcio que reconoce manosa) como dectina-1 (reconoce glucano), dectina-2 (reconoce manosa), Mincle (receptor de

macrófagos contra *Candida* sp) y de manosa (MR). TLR2, TLR4, dectina-1 y MR ejercen un efecto proinflamatorio. El tipo de respuesta iniciado por *Candida* sp depende de la interacción entre los PRR's expresados por los diferentes tipos celulares presentes en el sitio de infección. Polimorfonucleares, monocitos y macrófagos son importantes para el principal efector de la respuesta innata: fagocitosis de *Candida* sp y la inducción de especies reactivas de oxígeno que dañan y eliminan al hongo. Citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β son cruciales para la activación de polimorfonucleares. El INF- γ producido por linfocitos TCD4 es importante para la estimulación de la actividad antifúngica de los polimorfonucleares, induce la producción de óxido nítrico por macrófagos y la producción de anticuerpos específicos de *Candida* sp. El mecanismo exacto de la respuesta adaptativa por el cuál los anticuerpos protegen contra las levaduras es desconocido, pero incluye la inhibición del tubo germinativo, opsonización (marcaje para destrucción por fagocitos), supresión de la adhesión a la superficie del hospedero y control de la multiplicación. Las células epiteliales son otro recurso para la producción de citocinas proinflamatorias en la mucosa, jugando un papel central en la protección contra hongos al producir IL-8 (atrae neutrófilos y provoca su degranulación) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF: regulan función de progenitores hematopoyéticos) en respuesta a *Candida* sp. Las células epiteliales orales pueden sobre regular la actividad antifúngica de neutrófilos, este efecto es parcialmente dependiente de IL-1 α , y los neutrófilos a su vez sobre regulan la expresión de TLR4 de epitelio infectado. La respuesta adaptativa inmune, crucial para la protección antifúngica

es provocada por linfocitos Th1 (productor de INF- γ), Th2 (secretor de IL-4 e IL-5) y Th17 (generador de IL-17 e IL-22). Th1 responde en la inmunidad dependiente de fagocitosis para mantener el equilibrio de la flora y eliminar a las levaduras de los 6rganos infectados y es inducida por la presentaci6n del ant6geno en presencia de IL-12 (promueve linfocitos T y NK), Th2 responde en la infecci6n activando a los linfocitos B (productores de anticuerpos) y Th17, provocada y mantenida en presencia de IL-1 e IL-23, activa neutr6filos. Pero se ha observado que Th2 y Th17 tienen tambi6n un efecto perjudicial durante la infecci6n al agravar la inflamaci6n e infecci6n, dependiendo la cantidad y tiempo de su participaci6n [Masouka, 2004; Paulovicov6 et al., 2008; Romani, 1999; Van de Veerdonk et al., 2010].

Figura de la defensa del hospedero contra *Candida* sp (Van de Veerdonk et al., 2010).



3

Justificación

Las levaduras del género *Candida* son de las principales fuentes de infección intrahospitalaria y su frecuencia ha ido en aumento en la última década al reportarse como la cuarta o quinta causa de sepsis nosocomial. Se relaciona con 18.0–70.0 % de mortalidad, incluso con anfotericina B como tratamiento, la cuál puede ocurrir 48 horas después de la detección del hongo en sangre [Bougnoux et al., 1990; Fujita et al., 2006; Han et al., 1999; Masouka, 2004; Sendid et al., 2002; Yera et al., 2001].

Aunado a esto el diagnóstico es difícil de establecer debido a que los signos clínicos no son específicos, a veces se requiere de procedimientos invasivos para obtener las muestras necesarias y principalmente porque el cultivo a pesar de ser el “estándar de oro” requiere de seis a siete días para obtener crecimiento de los microorganismos; además, de que tiene poca sensibilidad y por lo tanto tiene una baja cantidad de resultados positivos [Martínez et al., 1998; Navarro et al., 1993; Rimek et al., 2003].

Es por esto que se han desarrollado nuevos métodos para el diagnóstico oportuno de candidosis sistémica, tal es el caso de la captura de manano y detección de anti-manano, de los cuáles hay varios reportes alrededor del mundo [Ellis et al., 2009; Fujita et al., 2006; Sendid et al., 1999; Sendid et al., 2002; Sendid et al., 2003; Sendid et al., 2004; White et al., 2005]. No existen estudios en México, ni en pacientes pediátricos, por lo que es importante conocer cómo es el comportamiento y el resultado de estas pruebas en pacientes pediátricos mexicanos.

Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Realizar un estudio comparativo de la efectividad de las pruebas de captura de antígeno manano y detección de anticuerpos anti-manano frente a los cultivos de *Candida* sp como ayuda en el diagnóstico oportuno de candidosis sistémica en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Objetivos específicos

- Analizar la presencia o ausencia de antígenos y anticuerpos en las muestras de suero por medio de los estuches Platelia® *Candida* Plus (Bio-Rad®).
- Realizar análisis estadístico de las técnicas para equiparar su sensibilidad y especificidad mediante tablas de contingencia y el cálculo del índice Kappa.
- Comparar las ventajas y desventajas de las diferentes herramientas de diagnóstico.
- Observar el impacto de las pruebas sobre la evolución inmediata del paciente.

Hipótesis

Sí los sueros analizados resultan positivos para captura de manano y/o detección de anti-manano, entonces habrá crecimiento de *Candida* sp en los cultivos de muestras estériles.

Material y métodos

1. TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Todos los sueros de pacientes con sospecha de candidosis invasiva que llegaron al Laboratorio de Micología del HIMFG para su estudio en el periodo comprendido de junio a noviembre de 2011.

2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

2.1. Criterios de inclusión: pacientes del HIMFG con sospecha de candidosis sistémica, con edades de 0–18 años, ambos sexos, con una muestra de sangre total para hemocultivo y una muestra de suero/plasma para la captura de antígeno y detección de anticuerpo.

2.2. Criterios de exclusión: pacientes con confirmación de septicemia causada por otro microorganismo diferente a *Candida* sp.

2.3. Criterios de eliminación: pacientes con muestras insuficientes para realizar los tres estudios (hemocultivo, captura de antígeno y detección de anticuerpo).

3. TÉCNICAS DE LABORATORIO.

3.1. Obtención y conservación de la muestra:

- a. Recibir las muestras de líquidos biológicos (orina, broncoaspirado, cavidad oral, etc) en recipiente estéril–desechable.
- b. Obtener las muestras de sangre total en tubo Vacutainer® (tapón lila para cultivo y tapón rojo para obtener el suero).
- c. Centrifugar el tubo de sangre total (rojo) por 10 min a 1000 g.
- d. Separar el suero en tubos de polipropileno.
- e. Almacenar a 2.0–8.0 °C hasta su procesamiento.

3.2. Examen directo:

- a. Realizar examen directo de las muestras biológicas, a excepción de sangre.
- b. Colocar la muestra entre porta y cubreobjetos con KOH al 20.0 %.
- c. Buscar las estructuras fúngicas (blastoconidias y/o pseudohifas) al microscopio a 40x.

3.3. Cultivo:

- a. En medio agar Sabouraud para obtener crecimiento y medio CHROMagar® para saber si hay más de una especie de *Candida*.
- b. Sembrar 1.5 mL de sangre total (con anticoagulante EDTA).
- c. Incubar a 37.0 °C y revisar diariamente.
- d. Si después de 10 días no hay crecimiento eliminar los cultivos y reportar sin crecimiento.

3.4. Tipificación:

a. Identificar las cepas de los cultivos positivos por medio del equipo automatizado Vitek[®] 2 (bioMérieux[®]) que se basa en el crecimiento del microorganismo y la utilización de los sustratos liofilizados, que se encuentran en los 63 pocillos de las tarjetas de inoculación del equipo, para su actividad metabólica por medio de los sustratos cromogénicos.

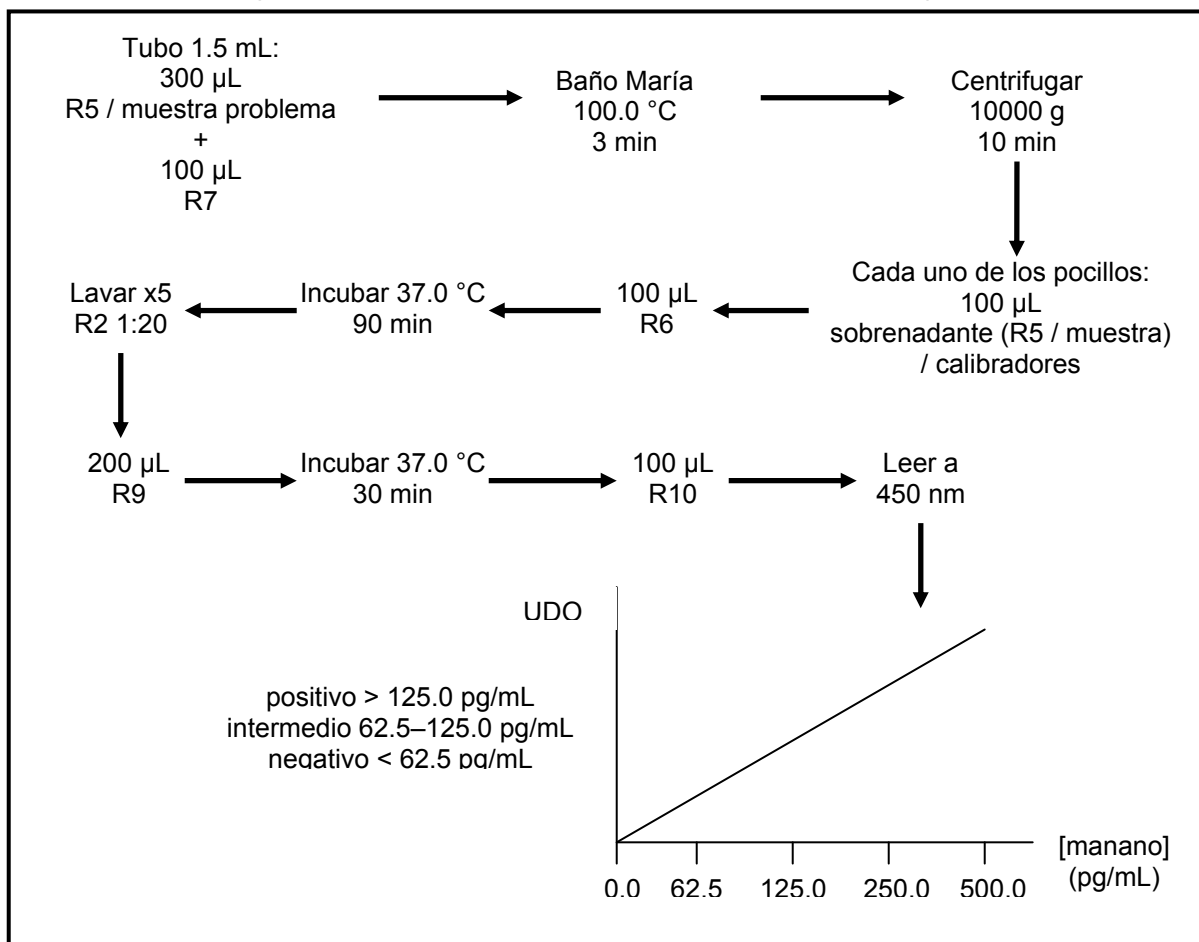
3.5. Captura de antígeno manano:

a. La técnica se realizó con el estuche comercial Platelia[®] *Candida* Ag Plus (Bio-Rad[®]) en base a las especificaciones del fabricante:

Tabla de reactivos de la prueba de captura de antígeno.

Reactivo	Componente	Función
R2	amortiguador Tris–NaCl pH 7.4, Tween [®] 20 al 2.0 %	solución de lavado, elimina lo que no reacciona
R3	amortiguador Tris–NaCl con 0.0 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	calibrador
R4a	amortiguador Tris–NaCl con 62.5 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	calibrador
R4b	amortiguador Tris–NaCl con 125.0 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	calibrador
R4c	amortiguador Tris–NaCl con 250.0 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	calibrador
R4d	amortiguador Tris–NaCl con 500.0 pg/mL manano de <i>C. albicans</i>	calibrador
R5	suero humano con manano	control positivo
R6	anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa y púrpura de bromocresol	conjugado, reacciona con el manano
R7	solución ácida de EDTA	solución de tratamiento, disocia complejos inmunes y precipita proteínas séricas
R9	3,3',5,5'–tetrametilbenzidina < 0.1 % y H ₂ O ₂ < 1.0 %	cromógeno, desarrolla un producto azul proporcional a la concentración de manano al ser oxidado por la peroxidasa
R10	H ₂ SO ₄ 1.0 N	solución de paro, detiene la reacción

Diagrama del procedimiento de ELISA de captura de antígeno.



3.6. Determinación de anticuerpo anti-manano:

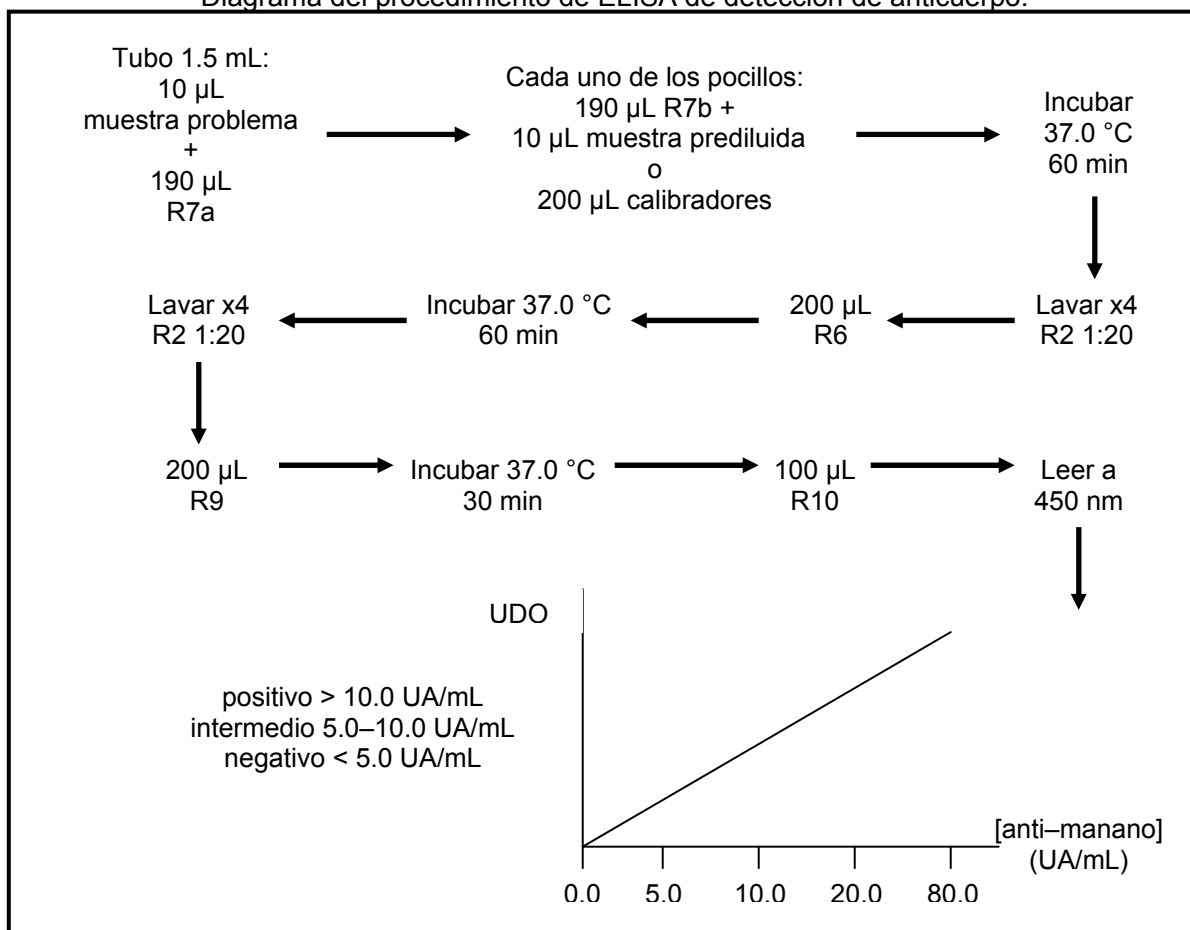
- a. La técnica se realizó con el estuche comercial Platelia[®] *Candida* Ab Plus (Bio-Rad[®]) en base a las especificaciones del fabricante:

Tabla de los reactivos de la prueba de detección de anticuerpo.

Reactivo	Componente	Función
R2	amortiguador Tris-NaCl pH 7.4, Tween [®] 20 al 2.0 %	solución de lavado, elimina lo que no reacciona
R3	amortiguador Tris-NaCl con 0.0 UA/mL Ig anti-manano	calibrador
R4a	amortiguador Tris-NaCl con 5.0 UA/mL Ig anti-manano	calibrador
R4b	amortiguador Tris-NaCl con 10.0 UA/mL Ig anti-manano	calibrador

R4c	amortiguador Tris–NaCl con 20.0 UA/mL Ig anti–manano	calibrador
R4d	amortiguador Tris–NaCl con 80.0 UA/mL Ig anti–manano	calibrador
R5	suero humano con manano	control positivo
R6	anticuerpos policlonales de cabra anti–IgG/IgA/IgM humano marcados con peroxidasa y verde de malaquita	conjugado, reacciona con los anti–manano
R7a	tampón Tris–NaCl, Tween® 20 al 0.1 % y rojo de fenol	diluyente de muestra 1
R7b	tampón Tris–NaCl, Tween® 20 al 0.1 % y azul de bromotimol	diluyente de muestra 2
R9	3,3',5,5'–tetrametilbenzidina < 0.1 % y H ₂ O ₂ < 1.0 %	cromógeno, desarrolla un producto azul proporcional a la concentración de anti–manano al ser oxidado por la peroxidasa
R10	H ₂ SO ₄ 1.0 N	solución de paro, detiene la reacción

Diagrama del procedimiento de ELISA de detección de anticuerpo.



4. PRUEBAS ESTADÍSTICAS.

- 4.1. Razones y proporciones:** valores numéricos y en porcentaje de todos los resultados obtenidos.
- 4.2. Tabla de contingencia:** número de pruebas positivas y pruebas negativas relacionadas con el número de pacientes enfermos y pacientes sanos.
- 4.3. Cálculo de sensibilidad y especificidad:** a partir de los resultados obtenidos en las tablas de contingencia.
- 4.4. Prueba de correlación:** determinación del índice Kappa.

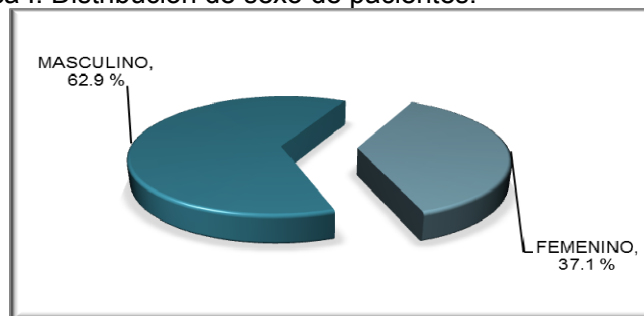
6

Resultados

De junio a noviembre de 2011 se recolectaron 84 muestras de suero de 62 pacientes, de los cuáles 39 fueron del sexo masculino y 23 del femenino:

Tabla 1, Gráfica I. Distribución de sexo de pacientes.

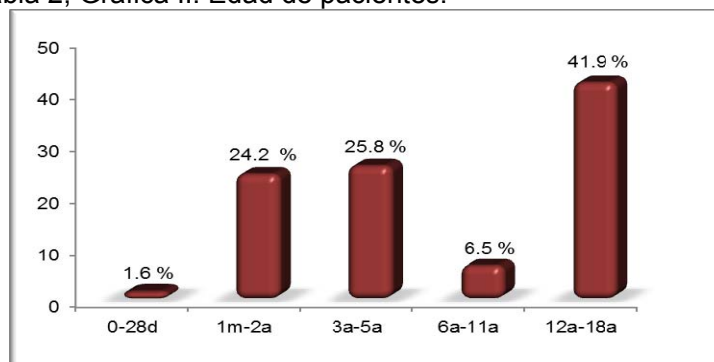
Sexo	#	%
masculino	39	62.9
femenino	23	37.1
total pacientes	62	100



Las edades comprendidas fueron desde tres días hasta 18 años:

Tabla 2, Gráfica II. Edad de pacientes.

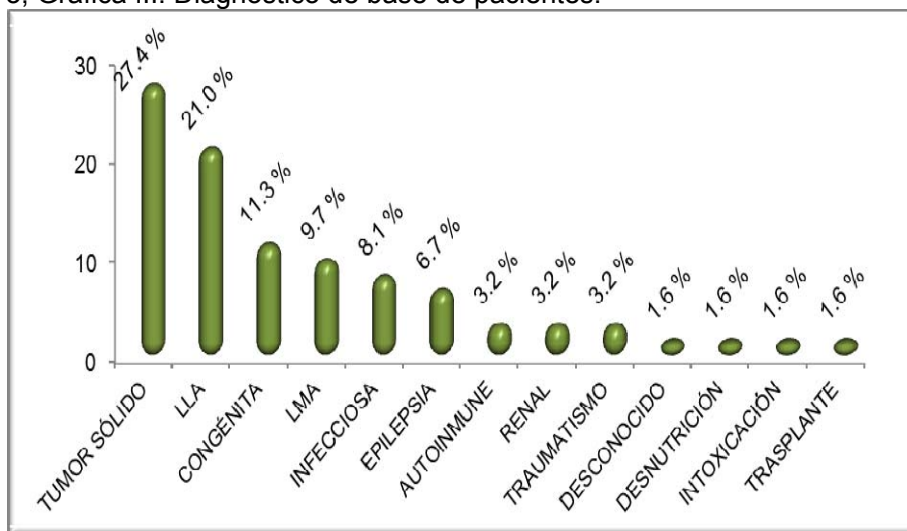
Edad	#	%
0–28 d	1	1.6
1 m – 2 a	15	24.2
3–5 a	16	25.8
6–11 a	4	6.5
2–18 a	26	41.9
total pacientes	62	100



Los diagnósticos de base de los pacientes fueron los siguientes:

Tabla 3, Gráfica III. Diagnóstico de base de pacientes.

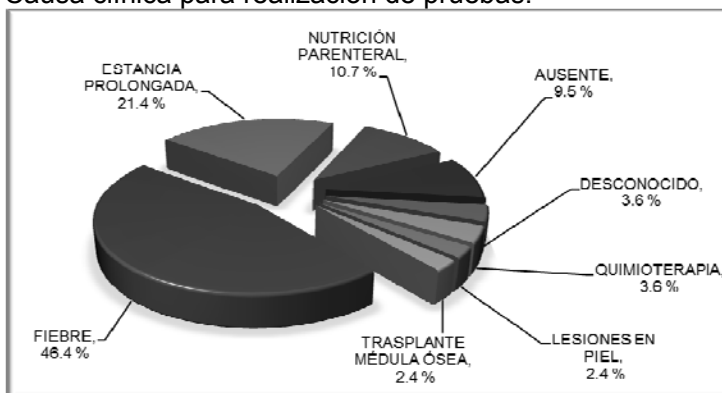
Diagnóstico	#	%
tumor sólido	17	27.4
LLA	13	21.0
congénita	7	11.3
LMA	6	9.7
infecciosa	5	8.1
epilepsia	4	6.5
autoinmune	2	3.2
renal	2	3.2
traumatismo	2	3.2
desconocido	1	1.6
desnutrición	1	1.6
intoxicación	1	1.6
trasplante	1	1.6
total pacientes	62	100



Las características clínicas o factores de riesgo por los que se solicitaron las pruebas serológicas fueron:

Tabla 4, Gráfica IV. Causa clínica para realización de pruebas.

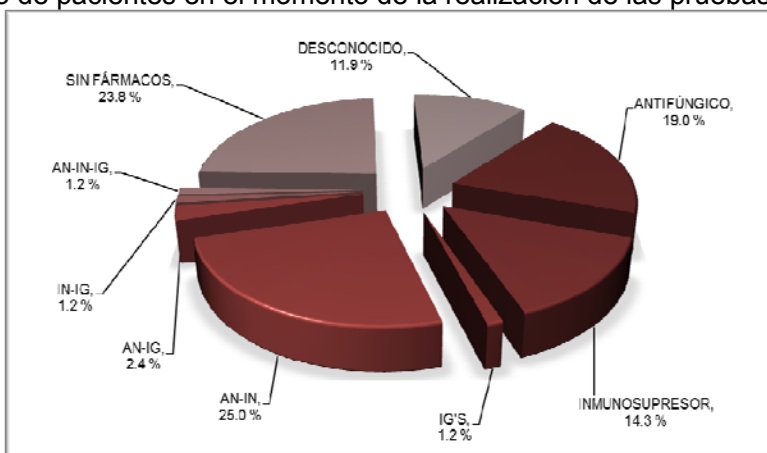
Característica o factor	#	%
fiebre	39	46.4
estancia prolongada	18	21.4
nutrición parenteral	9	10.7
ausente	8	9.5
desconocido	3	3.6
quimioterapia	3	3.6
lesiones en piel	2	2.4
trasplante médula ósea	2	2.4
total pruebas	84	100



Además de antibióticos, los pacientes tenían los siguientes fármacos:

Tabla 5, Gráfica V. Tratamiento de pacientes en el momento de la realización de las pruebas.

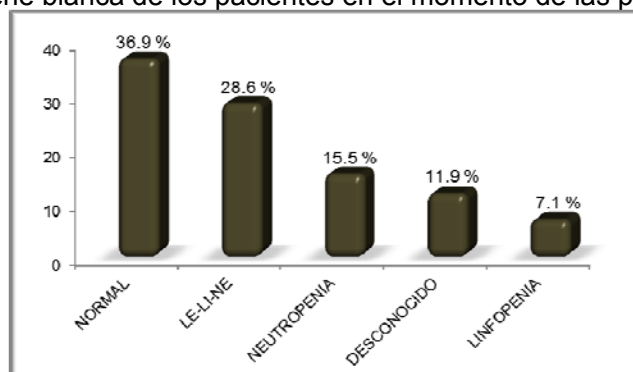
Fármaco	#	%
antifúngico	16	19.0
inmunosupresor	12	14.3
ig's	1	1.2
an-in	21	25.0
an-ig	2	2.4
in-ig	1	1.2
an-in-ig	1	1.2
sin fármacos	20	23.8
desconocido	10	11.9
total pruebas	84	100



El estado de la serie blanca al momento de la prueba fue:

Tabla 6, Gráfica VI. Estado de serie blanca de los pacientes en el momento de las pruebas.

Serie blanca	#	%
normal	31	36.9
le-li-ne	24	28.6
neutropenia	13	15.5
desconocido	10	11.9
linfopenia	6	7.1
total pruebas	84	100



Los datos de los controles (sanos) a los que se les realizaron las pruebas fueron:

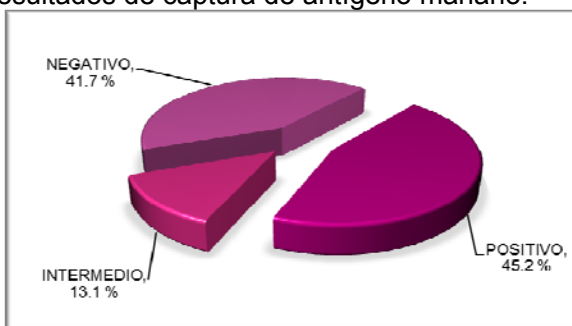
Tabla 7. Resultados de las pruebas serológicas que se realizaron a los controles.

Control	Sexo	Edad (años)	Manano (pg/mL)	Anti-manano (UA/mL)
I	F	10	11.36	23.51
II	M	5	11.59	1.96
III	F	13	12.01	50.49
IV	M	9	13.96	1.14
V	M	14	11.12	1.44

La cantidad de pruebas de captura de manano fueron:

Tabla 8, Gráfica VII. Resultados de captura de antígeno manano.

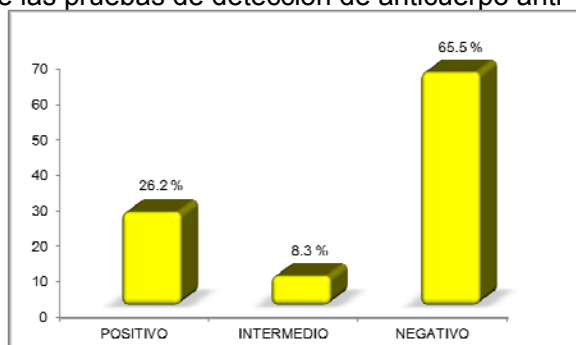
Manano	#	%
positivo	38	45.2
intermedio	11	13.1
negativo	35	41.7
total pruebas	84	100



Los resultados obtenidos de la detección de anti-manano:

Tabla 9, Gráfica VIII. Resultados de las pruebas de detección de anticuerpo anti-manano.

Anti-manano	#	%
positivo	22	26.2
intermedio	7	8.3
negativo	55	65.5
total pruebas	84	100



Para el análisis de las pruebas por individual y combinadas se presentan los resultados verdaderos (verdaderos positivos y verdaderos negativos), refiriéndose a la concordancia de las pruebas serológicas, la clínica de los pacientes y su evolución (las divisiones que tenían menos de tres muestras no se incluyeron en las tablas):

Tabla 10. Resultados verdaderos por grupo de edad.

Edad	Muestras	Resultados verdaderos		
		manano	anti-manano	combinadas
1 m – 2 a	14	9	6	3
3–5 a	20	16	12	9
6–11 a	6	4	5	3
12–18 a	30	22	12	9

Tabla 11. Resultados verdaderos por grupo de diagnóstico de base.

Diagnóstico	Muestras	Resultados verdaderos		
		manano	anti-manano	combinadas
tumor sólido	21	15	6	3
LLA	9	8	8	7
LMA	7	2	4	0
enfermedad congénita	9	5	5	2
enfermedad infecciosa	5	3	2	1
epilepsia	3	3	2	1
enfermedad autoinmune	4	3	3	2
enfermedad renal	4	4	2	2
traumatismo	3	2	3	2

Tabla 12. Resultados verdaderos por grupo de característica clínica.

Característica clínica	Muestras	Resultados verdaderos		
		manano	anti-manano	combinadas
fiebre	37	22	20	9
estancia prolongada	11	9	5	4
ausente	8	6	6	4
nutrición parenteral	8	7	3	3
quimioterapia	3	3	3	3

Tabla 13. Resultados verdaderos por grupo de tratamiento.

Tratamiento	Muestras	Resultados verdaderos		
		manano	anti-manano	combinadas
sin fármacos	19	16	9	7
an-in	18	9	8	3
antifúngico	14	10	11	7
inmunesupresor	11	9	7	5

Tabla 14. Resultados verdaderos por grupo de estado de serie blanca.

Estado de serie blanca	Muestras	Resultados verdaderos		
		manano	anti-manano	combinadas
normal	29	22	15	10
le-li-ne	24	14	13	6
neutropenia	9	7	6	4
linfopenia	5	5	3	3

Los resultados que fueron reportados y tomados en cuenta:

Tabla 15, Gráfica IX. Resultados reportados y tomados en cuenta para la decisión médica.

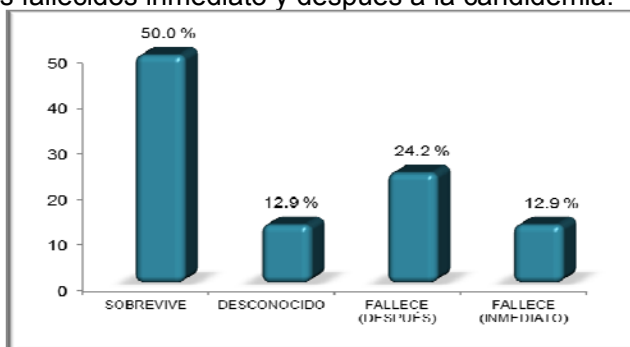
Resultado	#	%
no reportado	34	40.5
reportado (con impacto)	30	35.7
reportado (sin impacto)	10	11.9
desconocido	10	11.9
total pruebas	84	100



La evolución que presentó cada uno de los pacientes fue:

Tabla 16, Gráfica X. Pacientes fallecidos inmediato y después a la candidemia.

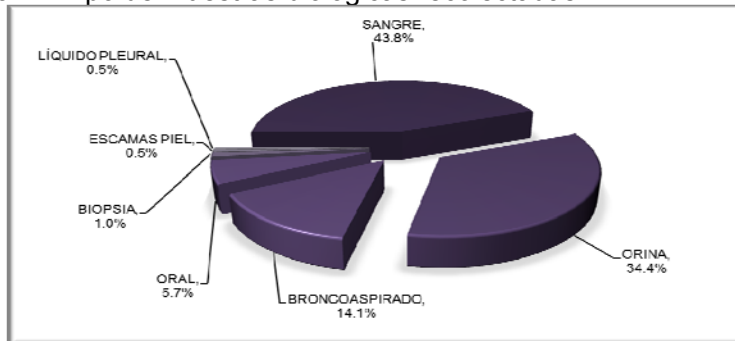
Evolución	#	%
sobrevive	31	50.0
desconocido	8	12.9
fallece (después)	15	24.2
fallece (inmediato)	8	12.9
total pacientes	62	100



Se obtuvo un total de 192 muestras biológicas:

Tabla 17, Gráfica XI. Tipo de muestras biológicas recolectadas.

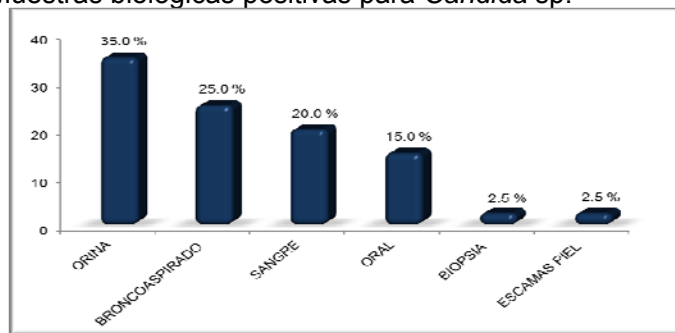
Muestra	#	%
sangre	84	43.8
orina	66	34.4
broncoaspirado	27	14.1
oral	11	5.7
biopsia	2	1.0
escamas de piel	1	0.5
líquido pleural	1	0.5
total muestras	192	100



Sólo 40 productos biológicos resultaron positivos a candidosis:

Tabla 18, Gráfica XII. Muestras biológicas positivas para *Candida* sp.

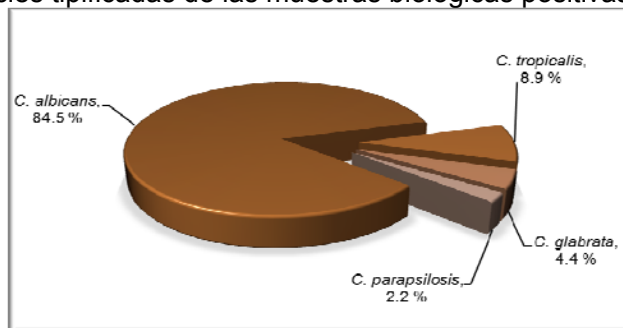
Muestra	#	%
orina	14	35.0
broncoaspirado	10	25.0
sangre	8	20.0
oral	6	15.0
biopsia	1	2.5
escamas de piel	1	2.5
total positivas	40	100



De estas muestras positivas se aislaron:

Tabla 19, Gráfica XIII. Especies tipificadas de las muestras biológicas positivas.

Especie	#	%
<i>C. albicans</i>	38	84.5
<i>C. tropicalis</i>	4	8.9
<i>C. glabrata</i>	2	4.4
<i>C. parapsilosis</i>	1	2.2
total cepas	45	100



En las siguientes tablas se resaltaron con gris los resultados positivos.

Trece pacientes tuvieron una muestra biológica (no sangre) positiva:

Tabla 20. Casos con una muestra positiva.

Sexo	Edad (años)	Diagnóstico	Tratamiento	Estado serie blanca	Clínica	Muestra biológica	Especie tipificada	[manano] (pg/mL)	[anti-manano] (UA/mL)
M	17	tumor sólido	antifúngico	normal	fiebre	oral	<i>C. albicans</i>	2.99	48.99
F	3 días	enfermedad congénita	sin fármacos	normal	ausente	orina	<i>C. albicans</i>	595.48	3.11
M	5	tumor sólido	sin fármacos	linfopenia	estancia prolongada	orina	<i>C. albicans</i>	216.13	1.78
F	3	LMA	antifúngico	normal	fiebre	oral	<i>C. albicans</i>	108.52	1.09
M	15	enfermedad renal	antifúngico, inmunosupresor	le-li-ne	estancia prolongada	oral	<i>C. albicans</i>	602.07	3.57
M	0.6	?	?	?	estancia prolongada	orina	<i>C. albicans</i>	170.12	1.66
M	0.25	epilepsia	antifúngico	normal	nutrición parenteral	orina	<i>C. albicans</i>	0.15	8.67
F	9	tumor sólido	antifúngico, inmunosupresor	le-li-ne	estancia prolongada	bronco-aspirado	<i>C. albicans</i>	242.90	4.22
M	3	LLA	inmunosupresor	neutropenia	estancia prolongada	orina	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	0.16	6.98
F	9	enfermedad autoinmune	an-in-ig	le-li-ne	fiebre	orina	<i>C. albicans</i>	66.26	34.88
M	15	LMA	antifúngico, inmunosupresor	le-li-ne	fiebre	oral	<i>C. albicans</i>	302.17	4.93
M	15	epilepsia	sin fármaco	linfopenia	fiebre	orina	<i>C. albicans</i>	25.59	81.96
M	15	LLA	antifúngico, inmunosupresor	neutropenia	estancia prolongada	biopsia esófago	<i>C. albicans</i>	51.83	1.05

Cinco pacientes tuvieron más de una muestra biológica (no sangre) positiva:

Tabla 21. Casos con más de una muestra positiva.

Sexo	Edad (años)	Diagnóstico	Tratamiento	Estado serie blanca	Característica clínica	Muestra biológica	Especie tipificada	[manano] (pg/mL)	[anti-manano] (UA/mL)
F	16	tumor sólido	antifúngico, inmunosupresor	le-li-ne	fiebre	bronco-aspirado	<i>C. albicans</i>	540.37	26.29
						orina	<i>C. albicans</i>		
F	3	enfermedad congénita	antifúngico	linfopenia	nutrición parenteral	bronco-aspirado (x3)	<i>C. albicans</i> (x3)	750.53	31.15
						orina	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>		
F	4	epilepsia	antifúngico,	normal	estancia	oral	<i>C. albicans</i>	186.95	3.71

			inmunosupresor		prolongada	orina	<i>C. albicans</i>		
F	3	LMA	antifúngico, inmunosupresor	le-li-ne	fiebre	bronco-aspirado (x2)	<i>C. albicans</i> (x2)	110.67	1.22
F	0.5	enfermedad infecciosa	?	?	?	oral	<i>C. albicans</i>	0.14	0.33
						orina	<i>C. albicans</i>		

Ocho hemocultivos fueron positivos:

Tabla 22. Datos de los ocho hemocultivos positivos.

Sexo	Edad (años)	Diagnóstico	Tratamiento	Estado serie blanca	Característica clínica	Especie tipificada	[manano] (pg/mL)	[anti-manano] (UA/mL)	Fallece
F	18	traumatismo	antifúngico, inmunosupresor	normal	estancia prolongada	<i>C. albicans</i>	583.80	17.73	no
F	13	tumor sólido	?	?	?	<i>C. tropicalis</i>	620.15	4.44	?
M	4	enfermedad infecciosa	antifúngico	normal	fiebre	<i>C. albicans</i>	625.23	16.25	no
M	5	traumatismo	sin fármaco	normal	fiebre	<i>C. albicans</i>	130.22	50.88	no
			antifúngico			<i>C. albicans</i>	11.45	91.58	
F	5	enfermedad infecciosa	inmunosupresor	normal	lesiones en piel	<i>C. albicans</i>	750.53	0.82	no
F	4	epilepsia	antifúngico, inmunosupresor	normal	estancia prolongada	<i>C. tropicalis</i>	144.23	3.57	?
M	15	enfermedad congénita	inmunosupresor	neutropenia	fiebre	<i>C. parapsilosis</i>	80.70	24.82	?

Cuatro pacientes tuvieron hemocultivo y otra muestra biológica positivos:

Tabla 23. Casos con sangre y otra muestra biológica positiva.

Sexo	Edad (años)	Diagnóstico	Tratamiento	Estado serie blanca	Característica clínica	Muestra biológica	Especie tipificada	[manano] (pg/mL)	[anti-manano] (UA/mL)
F	13	tumor sólido	?	?	?	sangre	<i>C. tropicalis</i>	620.15	4.44
						bronco-aspirado	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>		
M	4	enfermedad infecciosa	antifúngico	normal	fiebre	sangre	<i>C. albicans</i>	625.23	16.25
						orina	<i>C. albicans</i>		
M	5	traumatismo	sin fármaco	normal	fiebre	sangre	<i>C. albicans</i>	130.22	50.88
						bronco-aspirado (x2)	<i>C. albicans</i> (x2)		
F	5	enfermedad	inmunosupresor	normal	lesiones en	sangre	<i>C. albicans</i>	750.53	0.82

		infecciosa			piel	escamas de piel	<i>C. albicans</i>		
						orina	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>		
						orina	<i>C. albicans</i>		

Diecisiete pacientes tuvieron dos o tres muestras de suero:

Tabla 24. Pacientes con más de una muestra de suero

Sexo	Edad (años)	Diagnóstico	Tratamiento	Estado serie blanca	Característica clínica	Muestra biológica	Especie tipificada	[manano] (pg/mL)	[anti-manano] (UA/mL)
M	2	tumor sólido	an-in	neutropenia	fiebre	sangre (27 jun)	negativo	20.49	12.10
			sin fármaco	le-li-ne		sangre (06 jul)	negativo	3.52	18.02
F	16	trasplante	inmunosupresor	linfopenia	ausente	sangre (29 jun)	negativo	24.82	2.10
				normal		sangre (08 jul)	negativo	0.48	5.05
M	3	LLA	inmunosupresor	neutropenia	fiebre	sangre (15 jul)	negativo	1.07	7.18
						sangre (26 ago)	negativo	0.16	6.98
						orina	<i>C. tropicalis</i> <i>C. albicans</i>		
F	3	tumor sólido	sin fármaco	neutropenia	ausente	sangre (20 jul)	negativo	0.80	28.86
			antifúngico, inmunosupresor	leucopenia, linfopenia, neutropenia	fiebre	sangre (19 ago)	negativo	889.37	1.93
			antifúngico	sangre (07 oct)		negativo	42.09	18.59	
M	15	enfermedad renal	antifúngico, inmunoglobulina	leucopenia, linfopenia, neutropenia	estancia prolongada	sangre (12 ago)	negativo	602.07	3.57
						oral	<i>C. albicans</i>		
						sangre (16 ago)	negativo	765.86	1.85
F	16	tumor sólido	antifúngico, inmunosupresor	leucopenia, linfopenia, neutropenia	fiebre	sangre (12 ago)	negativo	540.37	26.29
						Orina	<i>C. albicans</i>		
						bronco-aspirado	<i>C. albicans</i>		
				normal		sangre (19 ago)	negativo	228.26	36.89
				normal		sangre (14 sep)	negativo	31.33	41.13
F	0.9	enfermedad congénita	antifúngico	normal	estancia prolongada	sangre (23 ago)	negativo	510.89	1.07
			antifúngico, inmunosupresor			sangre (25 ago)	negativo	335.53	1.15

M	5	traumatismo	sin fármaco	normal	fiebre	sangre (29 ago)	<i>C. albicans</i>	130.22	50.88
			bronco-aspirado			<i>C. albicans</i>			
			bronco-aspirado			<i>C. albicans</i>			
			antifúngico					sangre (09 sep)	<i>C. albicans</i>
F	4	epilepsia	antifúngico, inmunosupresor	normal	estancia prolongada	sangre (30 ago)	negativo	186.95	3.71
						orina	<i>C. albicans</i>		
						oral	<i>C. albicans</i>	144.23	3.57
						sangre (13 sep)	<i>C. tropicalis</i>		
M	13	tumor sólido	an-in	le-li-ne	fiebre	sangre (06 sep)	negativo	0.58	0.99
			inmunosupresor	linfopenia		sangre (20 sep)	negativo	905.15	0.27
						sangre (23 sep)	negativo	910.63	0.32
M	0.5	enfermedad congénita	sin fármaco	normal	fiebre	sangre (07 sep)	negativo	8.84	2.64
			inmunosupresor			sangre (28 sep)	negativo	976.71	0.47
			an-in			sangre (14 oct)	negativo	2.27	0.40
F	9	enfermedad autoinmune	antifúngico, inmunosupresor, inmunoglobulina	normal	fiebre	sangre (21 sep)	negativo	66.26	34.88
			inmunoglobulina			orina	<i>C. albicans</i>		
			inmunosupresor	le-li-ne	quimioterapia	sangre (19 oct)	negativo	185.21	11.21
M	15	LMA	antifúngico, inmunosupresor	leucopenia, linfopenia, neutropenia	fiebre	sangre (04 oct)	negativo	302.17	4.93
			orina			<i>C. albicans</i>			
			antifúngico				sangre (07 oct)	negativo	307.32
M	4	enfermedad renal	sin fármaco	normal	ausente	sangre (12 oct)	negativo	29.32	0.28
					fiebre	sangre (21 oct)	negativo	109.90	0.27
M	17	LLA	antifúngico, inmunosupresor	leucopenia, linfopenia, neutropenia	estancia prolongada	sangre (19 oct)	negativo	70.74	0.27
						sangre (28 oct)	negativo	168.21	0.14
F	5	tumor sólido	?	?	?	sangre (26 oct)	negativo	2.01	0.19
						sangre (16 nov)	negativo	3.47	0.03
M	15	LLA	antifúngico, inmunosupresor	neutropenia	estancia prolongada	sangre (11 nov)	negativo	51.83	1.05

						biopsia	<i>C. albicans</i>		
						sangre (16 nov)	negativo	105.97	0.03

Los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) de las pruebas fueron:

Antígeno:

Tabla 25. Datos de la prueba de captura de manano.

	Pacientes enfermos	Pacientes sanos	Total
Pruebas positivas	24 (VP)	12 (FP)	36
Pruebas negativas	8 (FN)	28 (VN)	36
Total	32	40	72

$$S = [VP / (VP + FN)] * 100 = [24 / (24 + 8)] * 100 = 75.0 \%$$

$$E = [VN / (FP + VN)] * 100 = [28 / (12 + 28)] * 100 = 70.0 \%$$

Anticuerpo:

Tabla 26. Datos de la prueba de detección de anti-manano.

	Pacientes enfermos	Pacientes sanos	Total
Pruebas positivas	10 (VP)	13 (FP)	23
Pruebas negativas	22 (FN)	27 (VN)	49
Total	32	40	72

$$S = [VP / (VP + FN)] * 100 = [10 / (10 + 22)] * 100 = 31.2 \%$$

$$E = [VN / (FP + VN)] * 100 = [13 / (13 + 27)] * 100 = 67.5 \%$$

Ambas pruebas:

Tabla 27. Datos de captura de manano y detección de anti-manano.

	Pacientes enfermos	Pacientes sanos	Total
Pruebas positivas	34 (VP)	25 (FP)	59
Pruebas negativas	30 (FN)	55 (VN)	85
Total	64	80	144

$$S = [VP / (VP + FN)] * 100 = [34 / (34 + 30)] * 100 = 53.1 \%$$

$$E = [VN / (FP + VN)] * 100 = [25 / (25 + 55)] * 100 = 68.7 \%$$

El índice Kappa de las pruebas fue:

Antígeno:

Tabla 28. Datos de cultivos en comparación con la prueba de antígeno.

	Cultivo positivo	Cultivo negativo	Total
Antígeno positivo	6 (a)	33 (b)	39 (r)
Antígeno negativo	2 (c)	43 (d)	45 (s)
Total	8 (t)	76 (u)	84 (N)

$$Po = (a + d) / N = (6 + 43) / 84 = 0.58$$

$$Pe = (rt + su) / N^2 = [(39)(8) + (45)(76)] / 84^2 = 0.53$$

$$K = (Po - Pe) / (1 - Pe) = (0.58 - 0.53) / (1 - 0.53) = 0.11$$

Anticuerpo:

Tabla 29. Datos de cultivos en comparación con la prueba de anticuerpo.

	Cultivo positivo	Cultivo negativo	Total
Anticuerpo positivo	5 (a)	17 (b)	22 (r)
Anticuerpo negativo	3 (c)	59 (d)	62 (s)
Total	8 (t)	76 (u)	84 (N)

$$Po = (a + d) / N = (5 + 59) / 84 = 0.76$$

$$Pe = (rt + su) / N^2 = [(22)(8) + (62)(76)] / 84^2 = 0.69$$

$$K = (Po - Pe) / (1 - Pe) = (0.76 - 0.69) / (1 - 0.69) = 0.22$$

Discusión de resultados

La candidosis diseminada es una complicación común entre pacientes inmunosuprimidos de cualquier edad y sexo. Se trabajaron muestras de 62 pacientes pediátricos: 39 (62.9 %) de hombres y 23 (37.1 %) de mujeres (Tabla 1, Gráfica I), lo cuál no es una diferencia significativa.

La edad de los pacientes estuvo comprendida desde tres días hasta 18 años. Las edades fueron ordenadas de acuerdo con la clasificación etaria de la UNICEF: recién nacidos prematuros (< 37 semanas de gestación), recién nacidos a término (0–28 días), lactantes y niños de corta edad (1 mes – 2 años), niños pre–escolares (3–5 años), niños escolares (6–11 años) y adolescentes (12–18 años) [UNICEF, 2011]. La mayoría de los pacientes fueron adolescentes (41.9 %), seguidos por los de edad pre–escolar (25.8 %) y lactantes (24.2 %), en menor cantidad los escolares (6.5 %) y sólo un paciente recién nacido a término (1.6 %) (Tabla 2, Gráfica II).

No se tuvo acceso a ocho expedientes, debido a que los niños estaban internados y por políticas del Hospital los expedientes no pueden ser prestados durante su internamiento; éstos aparecen como dato desconocido en las gráficas.

La mayor frecuencia en el diagnóstico fue el oncológico (tumores sólidos, leucemia linfoide y leucemia mieloide), al abarcar la mitad de éstos (58.1 %), un grupo de pacientes con alto grado de riesgo de una infección sistémica por *Candida* sp [Jones, 1990; Musial et al., 1988]. En segundo lugar (25.9 %) las enfermedades congénitas

(cardiopatía e hidrocefalea), las infecciosas (meningitis, fascitis necrotizante) y epilepsia; finalmente el menor grupo (14.4 %) fueron pacientes con enfermedades diversas como: autoinmunes (LES, síndrome linfoproliferativo), renales (síndrome nefrótico, insuficiencia renal), traumatismo craneoencefálico, desnutrición severa, intoxicación con herbicida y trasplante de corazón (Tabla 3, Gráfica III).

Dentro de las manifestaciones clínicas y/o factores de riesgo (Tabla 4, Gráfica IV) para adquirir una candidosis sistémica: la fiebre se presentó en el 46.4 % de los casos, 21.4 % llevaban una estancia hospitalaria prolongada, 10.7 % eran alimentados por vía endovenosa, 3.6 % estaban en ese momento en quimioterapia, 2.4 % presentaban lesiones en la piel y otros 2.4 % habían sido trasplantados de médula ósea recientemente. Todos éstos son factores importantes para el desarrollo de la candidosis invasiva [Denning et al., 1997; Reboli, 1993]; sin embargo el 9.5 % no presentó ninguno de estos factores.

Aunado a esto también hay que tomar en cuenta los fármacos que se administran al paciente y que pueden afectarlo y hacerlo más susceptible a la candidosis o que pueden interferir en el resultado de las pruebas de laboratorio. En primer lugar están los antibióticos de amplio espectro que de manera general reciben todos los pacientes (no considerados en Tabla 5, Gráfica V); después siguieron los fármacos antifúngicos (47.6 %), en particular anfotericina B, que se administra de manera preventiva en todos los pacientes con factores de riesgo y en muchos casos coincide con la toma de producto para la investigación de hongos; fármacos inmunosupresores (corticoesteroides) (41.7 %) y las inmunoglobulinas (6.0 %) como parte de la terapia. Los antibióticos al ser de amplio espectro atacan la flora habitual

y facilitan a que *Candida* sp aumente su población al no tener competencia; los antifúngicos pueden interferir en los resultados al provocar falsos negativos en la prueba de antígenos y los inmunosupresores dan falsos negativos en la determinación de anticuerpos. Por último, las inmunoglobulinas provocan falsos positivos en la prueba de cuantificación de anticuerpos [Denning et al., 1997; Morhart et al., 1994; Musial et al., 1988]. La administración de estos fármacos debe tomarse en cuenta al momento de la interpretación de los resultados.

Otro aspecto que hay que considerar es el estado inmune del paciente, ya que uno de los factores de riesgo de esta enfermedad es la neutropenia [Jones, 1990; Sendid et al., 2003], la cuál se presentó en el 44.1 % de los pacientes (28.6 % también estaba acompañado de leuco y linfopenia). Un dato que sobresale es que el 36.9 % no presentó alteración alguna en la serie blanca (Tabla 6, Gráfica VI).

Antes de la realización de las pruebas se corrieron cinco muestras controles de niños sanos, tres del sexo masculino y dos del sexo femenino de edades de cinco a 14 años, en los cuáles los valores de captura de antígeno fueron los esperados, todos por debajo del valor de corte (125.0 pg/mL), es decir, todos negativos. Esto coincide con la literatura que menciona que la prueba no se realiza en personas sanas porque el antígeno es uniformemente indetectable en esta población [Inserto Bio-Rad®; Lemieux et al., 1990]. No así con la detección de anticuerpos, donde dos de los resultados fueron positivos (23.51 UA/mL y 50.49 UA/mL), lo que se puede explicar al suponer que estos controles están colonizados sin implicar infección (Tabla 7). Esta situación debe tenerse en cuenta al momento de la interpretación de los

resultados, por qué es una de las razones que hace que la técnica pierda especificidad [Denning et al., 1997; Fah Yeo et al., 2002; Masouka, 2004].

Los resultados entre la técnica de captura de manano (45.2%) y detección de anticuerpo (26.2 %) con valor positivo no siempre coinciden en los pacientes (Tablas 8 y 9, Gráficas VII y VIII), lo esperado sería una concordancia entre las dos pruebas; pero no sucede porque a veces los pacientes pueden tener antifúngico y salir negativos a la captura de antígeno o están colonizados y resultan positivos a la detección de anticuerpos.

En todos los grupos etarios se presentó una cantidad similar de resultados verdaderos (verdaderos positivos y verdaderos negativos) (Tabla 10), incluso para los anticuerpos, a pesar de que las IgA, IgG e IgM llegan a su 100 % hasta los cinco años [Foro VI, 2011]. Cabe resaltar que en los lactantes no se obtuvo ningún verdadero positivo y fueron aumentando según la edad.

De los diferentes diagnósticos de base, los tumores sólidos fueron los que más resultados verdaderos de manano tuvieron, seguidos de LLA, enfermedad congénita y enfermedad renal. De anti-manano, LLA tuvo la mayoría de los resultados verdaderos, después tumores sólidos, enfermedad congénita y LMA; y en las pruebas combinadas LLA y tumores sólidos (Tabla 11). Esto indica que las técnicas tienen un mejor resultado entre los pacientes con enfermedades oncológicas, principalmente LLA y tumores sólidos, también encontrado en un estudio realizado en Colombia para determinar la eficacia de la técnica de manano en pacientes oncológicos hospitalizados [Marín et al., 2009].

En todas las características clínicas las pruebas dieron resultados verdaderos, lo que significa que estas técnicas se pueden indicar cuando un paciente presente algún factor de riesgo conocido para la candidosis sistémica (Tabla 12).

Los pacientes con tratamiento antifúngico e inmunosupresor y aquellos que no recibieron tratamiento tuvieron un alto número de resultados verdaderos en relación al total de muestras (Tabla 13). Algo similar se halló en un estudio realizado en pacientes con candidosis sistémica probada con terapia antifúngica, cuyos resultados no se vieron influenciados por los fármacos administrados [Sendid et al., 2004]. Sin embargo, cuando estaban juntos antifúngico e inmunosupresor hubo menos resultados verdaderos en las pruebas.

En base al estado de la serie blanca, los pacientes con neutropenia tuvieron más resultados verdaderos tanto de antígeno como de anticuerpo. En general, la prueba de manano fue más efectiva en cualquier condición de la serie blanca (Tabla 14), esto es por que el grado de inmunosupresión influencia la producción de anticuerpos y consecuentemente el aclaramiento del antígeno en circulación [Lemieux et al., 1990]. Así mismo, se sabe que en neutropénicos no se monta una respuesta de anticuerpos significativa a pesar de tener una infección profunda [Denning et al., 1997; Morhart et al., 1994] y que el antígeno es bajo porque las levaduras no liberan cantidades importantes de manoproteínas [Morhart et al., 1994].

Los reportes de laboratorio son un instrumento de trabajo que los médicos toman en cuenta para la decisión en beneficio del paciente. Del total de los datos reportados, 35.7 % sí influenciaron para el inicio de la terapia y 11.9 % no (Tabla 15, Gráfica IX),

lo que repercutió en la evolución del paciente en lo referente a la candidosis. Ocho pacientes fallecieron a causa de esta enfermedad (Tabla 16, Gráfica X).

El total de muestras biológicas que se analizaron durante este periodo de tiempo fueron 192. Los especímenes que más se obtuvieron fueron: sangre (43.8 %), orina (34.4 %) y broncoaspirado (14.1 %) y en menor cantidad muestras de cavidad oral (5.7 %), una biopsia de pulmón y otra de esófago (1.0 %), escamas de piel (0.5 %) y un líquido pleural (0.5 %) (Tabla 17, Gráfica XI). De estas muestras, sólo 40 fueron positivas: 35.0 % orina, 25.0 % broncoaspirado, 20.0 % sangre, 15.0 % oral, 2.5 % biopsia y 2.5 % escamas de piel (Tabla 18, Gráfica XII).

La especie más aislada fue *C. albicans* con un 84.5 %, lo que coincide con la bibliografía que indica que esta especie tiene una frecuencia de hasta un 85.0 % [Bonifaz, 2010], en segundo lugar se tipificó *C. tropicalis* (8.9 %), después *C. glabrata* (4.4 %) y por último *C. parapsilosis* (2.2 %), sólo en una muestra (Tabla 19, Gráfica XIII), principales patógenos reportados para inmunosuprimidos [Fujita et al., 1992; Sendid et al., 2002]. En cinco cultivos *C. albicans* estuvo asociada a otra especie, teniendo 45 aislados en 40 muestras.

Las muestras con *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* tuvieron resultados positivos para la prueba de antígeno, pero aunque sólo hubo una muestra con *C. parapsilosis* ésta tuvo como resultado un falso negativo, lo que indica que para algunas especies las pruebas no son tan específicas. 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* [Fujita et al., 1992; Lemieux et al., 1990; Rimek et al., 2003; Sendid et al., 2003], pero no para *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C.*

norvogensis y *C. parapsilosis* [Ellis et al., 2009; Fujita et al., 2006]. La prueba de anticuerpos funciona mejor con *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis* [Bougnoux et al., 1990; Fujita et al., 1992; Sendid et al., 2003]. Una de las explicaciones de esto es que el manano se encuentra en diferente concentración entre especies [Masouka, 2004; Pontón, 2006] y que el antígeno es reconocido por el anticuerpo monoclonal EBCA-1 específico para la fracción ácida de manano con residuos unidos por enlaces α , presentes en *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y en menor cantidad en *C. parapsilosis* y *C. krusei* [Poulain et al., 1997; Sendid et al., 2004].

En los casos de candidosis local, con un cultivo de *Candida* sp, seis tuvieron antígeno positivo y tres anticuerpo (Tabla 20), lo que indica la baja especificidad de las pruebas y, por lo tanto, deben ser correlacionadas con la clínica.

Denning et al. (1997) considera una candidosis diseminada cuando hay más de un sitio infectado; en los pacientes estudiados que tuvieron este fenómeno, el antígeno fue positivo en tres de ellos y el anticuerpo sólo en dos (Tabla 21). Los casos que cursan con candiduria sólo se pueden considerar como candidosis diseminada cuando el paciente presenta fiebre, por esto, la detección de manano en suero es útil para el diagnóstico de pielonefritis por *Candida* sp y para el monitoreo del tratamiento [Tokunaga et al., 1993].

La clasificación de la EORTC/MSG (Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer y el Grupo de Estudio de Micosis) divide a la enfermedad invasiva fúngica en probada, probable y posible. La probada requiere que el hongo sea detectado histológicamente o por cultivo. La probable necesita factores del paciente (trasplantes sólidos, inmunodeficiencias hereditarias, desordenes

conectivos, agentes inmunosupresivos), signos y síntomas clínicos y evidencia micológica. Y la posible incluye factores del hospedero y evidencia clínica sin soporte micológico [De Pauw et al., 2008; Pacheco, 2008]. Sólo el 9.5 % de todos los hemocultivos fueron positivos (Tabla 22) y estos casos se pueden catalogar como candidosis invasiva probada.

En los casos de cultivos positivos de una muestra de sangre y de otro producto biológico la prueba de antígeno coincidió en todos, mientras que el anticuerpo sólo en dos de ellos (Tabla 23). Así, se comprueba que en el paciente inmunosuprimido la técnica de anticuerpos puede resultar en falso negativo; entonces la mejor opción será la prueba de captura de manano. Sin embargo, puede no haber relación entre la gravedad de la infección y la cantidad de manano por la transitoriedad de la mananemia [Tokunaga et al., 1993]. Se considera indicativo de mal pronóstico cuando la prueba de antígeno es muy alta y la de anticuerpo baja, algo similar se presentó en dos casos, pero a pesar de esta observación, los pacientes no fallecieron [Ellis et al., 2009; Yera et al., 2001].

Diez y siete pacientes tuvieron dos o tres muestras de suero con intervalos de tiempo diferentes. Se observan diversos comportamientos, algunos pacientes se mantuvieron constantes con valores negativos o positivos respectivamente y otros presentaron seroconversión (positivo a negativo y negativo a positivo) (Tabla 24). Por esto, es importante que se trabajen muestras seriadas, la primera muestra debe ser la basal (tomada cuando inicia el internamiento) y las subsecuentes reflejan la variación del manano en circulación, porque su presencia es transitoria al ser removido rápidamente por la formación de complejos inmunes y por la endocitosis

mediada por receptores de las células de Kupffer en el hígado [Denning et al., 1997; Fah Yeo et al., 2002; Gutiérrez et al., 1993; Lemieux et al., 1990; Mitsutake et al., 1996; Morhart, 1994; Pontón, 2006; Sendid et al., 2002; Yera et al., 2001].

Es conocido que la técnica de captura de antígeno es la que presenta mayor sensibilidad (S) y especificidad (E), reflejado en estudios previos que reportan valores de S: 0.0–100 % y E: 61.0–100 % [Bougnoux et al., 1990; Ellis et al., 2009; Fujita et al., 2006; López et al., 2004; Rimek et al., 2003; Tokunaga et al., 1993; Verduyn et al., 2004], lo cuál coincide con los valores obtenidos en este estudio de S: 75.0 % y E: 70.0 %. Por el contrario, la técnica de anticuerpo tuvo valores de S: 31.2 % y E: 67.5 %, la especificidad si coincidió con lo reportado anteriormente (E: 18.4–94.0 %), pero la sensibilidad estuvo muy por debajo de aquellos reportes (S: 53.0–90.0 %) [Ellis et al., 2009; López et al., 2004; Quindós et al., 2004]. Finalmente, cuando se sumaron los resultados de las pruebas, se obtuvo S: 53.1 % y E: 68.7 % y de acuerdo con varios autores [Ellis et al., 2009; López et al., 2004; Quindós et al., 2004; Sendid et al., 2003; Yera et al., 2001] estos porcentajes deben ser más altos que los resultados de las pruebas de manera individual (S: 80.0–95.4 % y E: 52.6–100 %), lo que no sucedió en el estudio. Se tienen que considerar todas las variables que pueden influenciar estos valores: edad, sexo, padecimiento de base, condición inmunológica y número de muestras consecutivas [Ellis et al., 2009; Verduyn et al., 2004]. En este caso las diferencias podrían ser debidas a la edad de los pacientes, porque los reportes mencionados anteriormente corresponden a adultos.

El índice Kappa fue calculado para conocer la concordancia entre las pruebas serológicas y los cultivos. La captura de antígeno frente a los cultivos obtuvo un

índice de 0.11, lo que indica una concordancia insuficiente. La detección de anticuerpo contra los cultivos tuvo un índice de 0.22, que corresponde a una concordancia baja. Ambas pruebas presentaron valores muy bajos ya que el índice de concordancia perfecta es 1.0.

En la prueba de antígeno pueden presentarse falsos negativos porque para una reacción positiva se requiere una gran carga fúngica [Fah Yeo et al., 2002], además existe la capacidad de la pared celular de modular y/o evadir la respuesta inmune del hospedero, es decir, puede mostrar una variabilidad antigénica [Martínez et al., 1998]. Un punto crítico en la realización de la prueba de captura de antígeno sucede en el momento del rompimiento de los complejos inmunes, cuando se liberan los antígenos circulantes [Navarro et al., 1993]. La baja concentración de manano en suero, puede ser afectada por el aclaramiento mediado por anticuerpos y dar un falso negativo [Gutiérrez et al., 1993; López et al., 2004].

En la técnica de anticuerpos una consideración importante es la colonización, ya que la prueba no es capaz de diferenciar entre un paciente colonizado y uno infectado [Bougnoux et al., 1990; Denning et al., 1997; Fah Yeo et al., 2002; Fujita et al., 2006], esto se vio reflejado en 13 casos en donde se dio ese evento y se presentó como falso positivo. Varios estudios han mencionado que si la colonización es un factor de riesgo para la candidemia ¿por qué no se toma como alerta un valor alto de anticuerpos? [De Bernardis et al., 1993; Musial et al., 1988; Sendid et al., 2002]. Otro factor es la diferencia de tiempo, entre la infección y la producción de anticuerpos, lo que hace que disminuya el valor de la prueba, a pesar de que el paciente sea capaz de montar una respuesta inmune; debido a que en algunos casos los niveles de

anticuerpos han descendido y las manifestaciones clínicas apenas inician [Denning et al., 1997; Tokunaga et al., 1993]. Se puede explicar porque la técnica no distingue entre una infección actual y una pasada [Mitsutake et al., 1996], frecuente en pacientes inmunocomprometidos, en donde la respuesta inmunológica es retrasada, reducida o ausente [López et al., 2004; Pontón, 2006; Quindós et al., 2004; Sendid et al., 2002]. Sin embargo, hay que tomar en cuenta las ventajas de la determinación de anticuerpos, ya que al parecer los anti-manano son de las principales inmunoglobulinas en el suero humano al estimular al sistema inmune como resultado de colonización [Jones, 1990; López et al., 2004; Martínez et al., 1998].

Éstas no son las únicas limitantes en los dos tipos de pruebas, también se presentan reacciones cruzadas entre diferentes especies de hongos ambientales o comensales, falta de estandarización de los métodos [Fah Yeo et al., 2002], ciclos congelación–descongelación [Gutiérrez et al., 1993] y la amplitud de rangos entre los positivos, los intermedios y los negativos [Ellis et al.; 2009].

Además, en el empleo de todas las herramientas diagnósticas utilizadas en el laboratorio se tienen que tomar en cuenta otras ventajas y desventajas, por ejemplo: los exámenes directos son baratos, fáciles y rápidos de realizar, pero requieren experiencia y conocimiento de las estructuras microscópicas. Los cultivos también son de bajo costo; sin embargo, se necesitan de tres a 10 días para obtener crecimiento y tipificar la cepa desarrollada. Las técnicas histopatológicas son recursos más costosos, porque las muestras requieren de procesamiento y tinción especial, con la ventaja de tener el resultado en un día. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene la ventaja de la alta sensibilidad y especificidad y de ser un

proceso rápido; la desventaja es el alto costo, el equipo especializado y el personal capacitado, lo cuál hace que no sea una prueba muy utilizada como diagnóstico habitual en los laboratorios clínicos. Por último, las pruebas serológicas a pesar de ser de mayor costo, tienen la ventaja de dar resultados en cuatro horas como máximo y el procedimiento es fácil de realizar en cualquier laboratorio.

Por tal razón, como es discutido por varios autores, se deben tomar en cuenta ciertas consideraciones para la realización de estas pruebas: monitorear la cinética de los antígenos y anticuerpos para tener un conocimiento del comportamiento de las diferentes formas clínicas de candidosis [Zöller et al., 1991], combinar dos o más de estos ensayos para aumentar la confiabilidad del diagnóstico [Fujita et al., 2006; Pontón, 2006; Takazono et al., 2011], usar una técnica que detecte múltiples epítomos para incrementar la sensibilidad de captura del antígeno (compensando la transitoriedad por la circulación) [Poulain et al., 1997; Sendid et al., 2004], correlacionar los resultados obtenidos con la clínica del paciente [Morhart et al., 1994] y combinar los métodos tradicionales con estas pruebas para dar un mejor resultado [Fah Yeo et al., 2002; López et al., 2004].

8

Conclusiones

- Las pruebas serológicas Platelia[®] *Candida* Plus (Bio-Rad[®]) tienen baja especificidad para diferenciar entre una candidosis sistémica y una candidosis local.
- Los resultados más concordantes con la clínica se presentaron en pacientes oncológicos (leucemia linfocítica aguda y tumores sólidos), de cualquier edad y factor de riesgo, con neutropenia y sin fármacos (antifúngico, inmunosupresor e inmunoglobulinas).
- El diagnóstico de la candidosis diseminada sólo es posible, cuando se trabajan conjuntamente la clínica del paciente, las técnicas directas y las pruebas serológicas.
- Es necesario la realización de más estudios con mayor número de pacientes y muestras para comprobar la verdadera eficacia de estas pruebas serológicas en pacientes pediátricos y así apoyar el diagnóstico de candidosis sistémica.

Bibliografía

Las referencias están ajustadas a las normas adoptadas por la *U.S. National Library of Medicine*.

- Bonifaz A. Candidosis En: *Micología Médica Básica*. McGrawHill; 2010. 279–302 pp.
- Bounoux M, Hill C, Moissenet D, De Chauvin MF, Bonnay M, Vicens–Sprael I, Pietri F, McNeil M, Kaufman L, Dupouy–Camet J, Bohuon C, Andremont A. Comparison of antibody, antigen, and metabolite assay for hospitalized patients with disseminated or peripheral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1990; 28:905–909.
- Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72:495–544.
- De Bernardis F, Girmenia C, Boccanera M, Adriani D, Martino P, Cassone A. Use of a monoclonal antibody in a dot immunobinding assay for detection of a circulating mannoprotein of *Candida* spp. in neutropenic patients with invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:3142–3146.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler

CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE. Revised definitions of invasive fungal disease from the 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.

- Denning DW, Evans EGV, Kibbler CC, Richardson MD, Roberts MM, Rogers TR, Warnock DW, Warren RE. Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:424–436.
- 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.
- Fah Yeo S, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:465–484.
- Faille C, Mackenzie DWR, Michalski JC, Poulain D. Evaluation of an enzyme immunoassay using neoglycolipids constructed from *Candida albicans* oligomannosides to define the specificity of anti-mannan antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11:438–446.

- Fondo de Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). Online Suministros y logística (Fecha de acceso: 25-11-2011). Disponible en: http://www.unicef.org/spanish/supply/index_53571.html.
- Foros VI. Online Órganos y células que defienden al cuerpo contra infecciones (Fecha de acceso: 07-12-2011). Disponible en: http://www.vi.cl/foro/topic/5698-enfermedades-autoinmunes-capitulos-de-inmunologa-apuntes-entendiendo-al-sistemainmunolgico/page__st__60>.
- Fujita S, Hashimoto T. Detection of serum *Candida* antigens by enzyme-linked immunosorbent assay and a latex agglutination test with anti-*Candida albicans* and anti-*Candida krusei* antibodies. J Clin Microbiol 1992; 30:3132-3137.
- Fujita S, Takamura T, Nagahara M, Hashimoto T. Evaluation of a newly developed down-flow immunoassay for detection of serum mannan antigens in patients with candidaemia. J Med Microbiol 2006; 55:537-543.
- Gutiérrez J, Maroto C, Piédrola G, Martín E, Pérez JA. Circulating *Candida* antigens and antibodies: useful markers of candidemia. J Clin Microbiol 1993; 31:2550-2552.
- Han Y, Ulrich MA, Cutler JE. *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. J Infect Dis 1999; 179:1477-84.
- Insertos Platelia® *Candida* Plus (Bio-Rad®).
- Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Clin Microbiol Rev 1990; 3:32-45.

- Lemieux C, St-germain G, Vincelette J, Kaufman L, De Repentigny L. Collaborative evaluation of antigen detection by a comercial latex agglutination test and enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 1990; 28:249–253.
- López–Ribot JL, Casanova M, Murgui A, Martínez JP. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *Immunol Med Microbiol* 2004; 41:187–196.
- Marín Pulgarin EM, Rincón Triana LT. Utilidad clínica de la detección del antígeno de manano para diagnóstico de candidiasis invasiva en pacientes oncológicos [tesis]. Bogotá (Colombia). Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
- Martínez JP, Gil ML, López–Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:121–141.
- Masouka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:281–310.
- Morhart M, Rennie R, Ziola B, Bow E, Louie TJ. Evaluation of enzyme immunoassay for *Candida* cytoplasmic antigens in neutropenic cancer patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32:766–776.
- Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, Yamamoto Y, Kakeya H, Otsubo T, Kawamura S, Hossain MA, Noda T, Hirakata Y, Kohno S. Enolase antigen, mannan antigen, Cand–Tec antigen, and β -glucan in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1918–1921.

- Musial CE, Cockerill III FR, Roberts GD. Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1:349–364.
- Navarro D, Monzonis E, López–Ribot JL, Sepúlveda P, Casanova M, Nogueira JM, Martínez JP. Diagnosis of systemic candidiasis by enzyme immunoassay detection of specific antibodies to mycelial phase cell wall and cytoplasmic candidal antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:839–846.
- Nelson RD, Shibata N, Podzorski RP, Herron M. *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell–mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:1–19.
- Pacheco Silva AL. Valor diagnóstico del título serológico del manano de *Candida* y la proteína C reactiva en pacientes con neoplasia hematolinfóide y neutropenia con factor de riesgo de candidiasis invasiva [tesis]. Bogotá (Colombia). Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
- Paulovicová E, Bystrický S, Machová E, Bujdáková H. Immune responsiveness of a novel peptidoglycan conjugate prepared from surface *Candida* immunogens: mannan and CR3–related protein. *Immunol Med Microbiol* 2008; 53:421–428.
- Phillips P, Dowd A, Jewesson P, Radigan G, Tweeddale MG, Clarke A, Geere I, Kelly M. Nonvalue of antigen detection immunoassay for diagnosis of candidemia. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2320–2326.

- Pontón J. El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23:20–25.
- Poulain D, Jouault T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7:342–349.
- Poulain D, Robert R, Mesnard F, Sendid B, Lepage G, Camus D. Clearances of *Candida albicans* derived α - and β -linked mannose residues in sera from patients with candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:16–20.
- Quindós G, Moragues MD, Pontón J. Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis? *Rev Iberoam Micol* 2004; 21:10–14.
- Reboli AC. Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay for *Candida* antigen detection. *J Clin Microbiol* 1993; 31:518–523.
- Rimek D, Singh J, Kappe R. Cross-reactivity of the PLATELIA *CANDIDA* antigen detection enzyme immunoassay with fungal antigen extracts. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3395–3398.
- Romani L. Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2:363–367.
- Sendid B, Caillot D, Baccouch–Humbert B, Klingspor L, Grandjean M, Bonnin A, Poulain D. 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; 41:4551–4558.

- Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M, Poulain D. Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of α - and β -linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:164–171.
- Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D, Poulain D. Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol* 2002; 51:433–442.
- Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1510–1517.
- Takazono T, Izumikawa K, Nagayoshi Y, Tanaka A, Mihara T, Kosai K, Saijo T, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kamihira S, Kohno S. Evaluation of the Cica Fungi Test *Candida*, a novel serum *Candida* mannan antigen kit, and its comparison with Cand–Tec in candidemia patients. *Jpn J Infect Dis* 2011; 64:116–120.
- Tokunaga S, Ohkawa M, Takashima M. Diagnostic value of determination of serum mannan concentrations in patients with candiduria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:542–545.
- Van de Veerdonk FL, Netea MG, Joosten LA, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Novel strategies for the prevention and treatment of *Candida* infections: the potencial of immunotherapy. *Microbiol Rev* 2010; 34:1063–1075.

- Verduyn Lunel FM, Voss A, Kuijper EJ, Gelinck LBS, Hoogerbrugge PM, Liem KL, Kullberg BJ, Verweij PE. Detection of the *Candida* antigen mannan in cerebrospinal fluid specimens from patients suspected of having *Candida* meningitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:867–870.
- Wheat LJ. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. *Clin Chest Med* 2009; 30:367–377.
- 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; 43:2181–2187.
- Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:864–870.
- Zöller L, Krämer I, Kappe R, Sonntag HG. Enzyme immunoassay for invasive *Candida* infections: reactivity of somatic antigens of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1991; 29:1860–1867.