

**UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO DE MANANO
PARA DIAGNOSTICO DE CANDIDIASIS INVASIVA EN PACIENTES
ONCOLÓGICOS**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA



**EDNA MARGARITA MARIN PULGARIN
LEIDY TATIANA RINCON TRIANA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
BACTERIOLOGIA
BOGOTÁ D.C., NOVIEMBRE DE 2009**

**UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO DE MANANO
PARA DIAGNOSTICO DE CANDIDIASIS INVASIVA EN PACIENTES
ONCOLÓGICOS**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA



**EDNA MARGARITA MARIN PULGARIN
LEIDY TATIANA RINCON TRIANA**

APROBADO

**Ingrid Schuler, Ph.D
DECANA ACADÉMICA**

**Luz Amparo Maldonado
DIRECTORA DE CARRERA**

**Melba Linares
JURADO**

**Carlos Hernando Gómez
JURADO**

UTILIDAD CLINICA DE LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO DE MANANO
PARA DIAGNÓSTICO DE CANDIDIASIS INVASIVA EN PACIENTES
ONCOLÓGICOS

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD JAVERIANA

EDNA MARGARITA MARIN PULGARIN
LEIDY TATIANA RINCON TRIANA

APROBADO



DRA. PILAR RIVAS
MICÓLOGA MÉDICA INC
DIRECTORA



DRA. SONIA CUERVO
MÉDICA INFECTÓLOGA INC
CODIRECTORA



Dr. RICARDO SÁNCHEZ
MÉDICO EPIDEMIOLOGO
ASESOR ESTADÍSTICO

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

TABLA DE CONTENIDO

1	RESUMEN	7
2	INTRODUCCIÓN	8
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
4	JUSTIFICACIÓN	10
5	MARCO TEORICO	11
5.1	Etiología.....	11
5.2	Patogénesis.....	11
5.3	Epidemiología	12
5.4	Manifestaciones clínicas	13
5.5	Incidencia de infección por Candida spp. En el Instituto Nacional de Cancerología (INC).....	14
5.6	Diagnóstico de laboratorio de las micosis por hongos levaduriformes	14
5.7	Técnica de ELISA para detección de antígenos de manano.	15
6	OBJETIVOS	17
6.1	Objetivo general	17
6.2	Objetivos específicos	17
7	METODOLOGÍA	18
7.1	Tipo de estudio.....	18
7.2	Hipótesis	18
7.3	Definición de sujetos en estudio.....	18
7.3.1	Población.....	18
7.3.2	Muestra	19
7.3.3	Criterios de elegibilidad.....	19
7.4	Técnica.....	20
7.5	Procedimiento (ver anexo 3).....	20
7.5.1	Recolección de Muestras (ver anexo 7).....	20
7.6	Administración de los datos de investigación y análisis estadístico	20
8	RESULTADOS	22
8.1	Pacientes en estudio.....	22
8.2	Variables diagnosticas	22
8.2.1	Hemocultivo y agentes etiológicos aislados	22
8.2.2	Detección del antígeno de manano.....	23
8.3	Variables clínicas	24

8.3.1	Descripción variables demográficas, enfermedad neoplásica de base y factores de riesgo para Candidemia.	24
8.3.2	Factores de riesgo	25
8.4	Uso de antibióticos y antifúngicos	27
9	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	29
10	CONCLUSIONES	32
11	RECOMENDACIONES.....	33
12	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	34
13	ANEXOS	37
	ANEXO 7	49
	Recolección de Muestras	49

1 RESUMEN

La detección de manano en suero es considerada una herramienta útil para el diagnóstico precoz y seguimiento de candidiasis invasiva, considerada como una de las principales infecciones en pacientes oncológicos de alto riesgo. La técnica PLATELIA™ CANDIDA Ag® Bio Rad es una técnica inmunoenzimática de tipo sándwich en microplaca, que permite la detección cuantitativa o cualitativa del antígeno de manano circulante en sueros humanos. Este trabajo tiene como objetivo principal, determinar la utilidad diagnóstica de la técnica de manano en pacientes oncológicos. Se llevó a cabo un estudio de tipo prospectivo durante el periodo comprendido de enero a julio del año 2009 en el Instituto Nacional de Cancerología con pacientes hospitalizados. De 1156 pacientes, 227, cumplieron con los criterios de elegibilidad, en donde se analizaron, sus características clínicas y factores de riesgo, asociados con los títulos serológicos de manano y si tenían relación directa con los títulos antigénicos positivos, se hizo un análisis estadístico con el programa STATA 9.2®. Los resultados arrojaron que de 227 pacientes solo 9 presentaron aislamiento positivo para *Candida spp.* del hemocultivo y solo seis con títulos positivos para manano. Se encontró, que existía una relación, de los nueve pacientes con aislamiento de la levadura, a partir del hemocultivo, y los títulos antigénicos positivos presente, sin embargo, más asociado a un diagnóstico de tumor sólido. Con la característica de resaltar, que en aquellos pacientes, con un antecedente quirúrgico, con diagnóstico de un proceso infeccioso, o factor de riesgo de EFI, o que se encuentren, hospitalizados en la UCI, con la relación etiológica especie-específica, la prueba de Manano de *Candida* tiene una utilidad real, para el diagnóstico de la CI.

2 INTRODUCCIÓN

La Candidiasis Invasiva (CI) es una de las principales infecciones de origen fúngico, causal en pacientes oncológicos con neutropenia prolongada y con tratamiento con esteroides, siendo la causa importante de morbimortalidad en este grupo de pacientes.

Esta infección puede ocurrir con mayor riesgo en pacientes que se encuentran en cuidados intensivos y en el servicio quirúrgico, la tasa de mortalidad atribuible a la candidemia está en un rango entre el 40% y el 60% [1]. Las dificultades para el establecimiento de un diagnóstico temprano y específico de la infección por *Candida spp.* Es bajo, debido a su difícil recuperación en los hemocultivos [2]. La existencia de pruebas de diagnóstico precoz, como lo es la detección del antígeno de manano, se proyecta como la herramienta para el diagnóstico de candidemias en aquellos pacientes con un factor de riesgo alto, debido a que su especificidad es alta, la cual alcanza un 70 % con respecto a otras pruebas [3].

Este estudio pretende hacer una evaluación de la utilidad clínica de la detección de antígenos de manano de *Candida* para el diagnóstico de infección invasiva en pacientes oncológicos del Instituto Nacional de Cancerología (INC).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la alta incidencia de las infecciones fúngicas invasivas por *Candida spp.* En pacientes inmunocomprometidos de tipo oncológico, se ha visto la necesidad de utilizar herramientas que ayuden en un diagnóstico rápido y efectivo de la infección, para el inicio de un tratamiento adecuado. Los factores de riesgo asociados a las infecciones invasivas serían entre otros: el desarrollo de nuevos regímenes de tratamiento quimioterapéutico para el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias hematológicas, y la utilización de fármacos inmunosupresores, que permiten que los pacientes se encuentren en alto riesgo de adquirir infecciones ya sea de tipo bacteriano o tipo fúngico. [1,2]

El diagnóstico temprano y la detección precoz de una CI sigue teniendo muchas dificultades; el porcentaje de positividad del hemocultivo para este tipo de hongos en el mejor de los casos es de un 30% a un 40%, actualmente se utilizan métodos serológicos, que ayudan en su diagnóstico, como la detección de antígenos de manano. En estudios recientes dirigidos a determinar la utilidad de estas pruebas diagnósticas, se ha establecido que el uso de la prueba sola o en forma combinada, con la detección de anticuerpos, pueden mejorar y complementar el diagnóstico de las Candidemias de una manera precoz y eficiente [2].

4 JUSTIFICACIÓN

Dada la dificultad para el diagnóstico de las Candidiasis Invasivas, el uso de pruebas serológicas son una herramienta de ayuda clínica para un diagnóstico temprano de la Enfermedad Fúngica Invasiva (EFI), y ayudan a establecer la presencia de antígenos de manano de *Candida* de una manera rápida y eficaz, además se convierte en una guía para el tratamiento de la infección invasiva por hongos, sobre todo en aquellos pacientes con alto riesgo de infección, por su patología de base o su tratamiento oncológico asociado.

Para el Instituto es importante el desarrollo y la implementación de técnicas inmunológicas que permitan el diagnóstico oportuno y el tratamiento adecuado de los pacientes, con mayor riesgo de EFI.

5 MARCO TEORICO

5.1 Etiología

Las Candidiasis son enfermedades causadas por hongos del género *Candida*. Estas enfermedades se pueden dividir en invasivas y mucocutáneas. Siendo las invasivas las menos frecuentes, pero las más graves asociadas con porcentajes de mortalidad elevadas. [4,5]

Al género *Candida* pertenecen aproximadamente 150 especies, las cuales en su mayoría crecen únicamente en forma de blastoconidias o levaduras, se dividen por gemación. Algunas especies forman pseudomicelios o pseudohifas. [4]

C. albicans es la más frecuente especie aislada en humanos, siendo un habitante normal de la orofaringe, la piel, las membranas mucosas, y de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. Sin embargo existen otras especies capaces de producir patogenicidad en el ser humano. [5] (Tabla 1).

<ul style="list-style-type: none">• <i>C. albicans</i>• <i>C. tropicalis</i>• <i>C. parapsilosis</i>• <i>C. krusei</i>• <i>C. guilliermondii</i>• <i>C. glabrata</i>

Tabla 1. Especies de *Candida spp.* De importancia clínica.

5.2 Patogénesis

Existen tres factores principales que influyen en la presentación de CI que incluyen, [1] el incremento de la colonización fúngica, resultado principalmente del uso de agentes antimicrobianos; [2] el rompimiento de las barreras

mucosas y epiteliales y [3] la disfunción inmune. Además, *Candida spp* Tiene la capacidad de adherirse a las células epiteliales, linfocitos y al material plástico, permitiendo la formación de biopelículas como parte del desarrollo y propagación de la CI.

Todo el sistema inmune está involucrado en el control de las infecciones por *Candida*. Los linfocitos son cruciales en el desarrollo de células mediadoras de inmunidad ante *Candida spp.* y en la prevención de la candidiasis, los pacientes que sufren deficiencias o defectos de las células T, tienen una mayor predisposición a desarrollar candidiasis mucocutáneas. Los pacientes que presentan condiciones asociadas con neutropenia tienen una mayor predisposición al desarrollo de CI y candidemia. Las células del complemento y las inmunoglobulinas son necesarias para la destrucción del patógeno, la deficiencia de alguna de estas se podría asociar a enfermedades más complicadas. Los factores iatrogénicos son los que tienen una mayor influencia en la patogénesis de la CI [1].

5.3 Epidemiología

Las especies pertenecientes al género *Candida* poseen una amplia distribución geográfica [4]. Se pueden encontrar haciendo parte de la microflora normal humana y de animales de sangre caliente, en particular *C. albicans*, se puede encontrar en las mucosas gastrointestinal, respiratoria y genitourinaria. En estos sitios anatómicos se comportan como saprofitos y su aislamiento de especímenes clínicos no implica por si solo la presencia de infección [5].

En diferentes estudios se ha encontrado que en pacientes inmunocomprometidos, estas levaduras dejan de comportarse como saprofitos y empiezan a ser patógenos, se han encontrado diferentes factores de riesgo asociados a que el paciente adquiera una EFI. Algunos de estos factores son descritos en la tabla 2.

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A CANDIDIASIS INVASIVA
Estancia prolongada en UCI
Falla renal
Hemodiálisis
Uso de antibióticos de amplio espectro
Catéter central venoso
Nutrición parenteral
Drogas inmunosupresoras
Cáncer y quimioterapia
Pancreatitis aguda
Colonización por <i>Candida</i> en diferentes lugares
Cirugías
Trasplantes

Tabla 2. Factores de riesgo de la Candidiasis Invasiva [1]

5.4 Manifestaciones clínicas

La CI como su nombre lo indica puede afectar cualquier órgano, y como tal, tiene una gran variedad de manifestaciones clínicas. Cuando el hongo se disemina, pueden verse afectados múltiples órganos, como el riñón, el cerebro y el miocardio. Del 15% al 40% de todas las Candidemias se pueden diagnosticar de manera precoz, lo que permite instaurar un tratamiento adecuado [6].

La utilización profiláctica o anticipada de tratamientos antifúngicos introduce cambios importantes en los porcentajes de manifestación de las CI. Los reportes en la literatura, demuestran que en las últimas décadas la incidencia de candidemia asociada por *C. albicans* está disminuyendo y en cambio ha aumentado por otras especies de *Candida*.

5.5 Incidencia de infección por *Candida spp.* En el Instituto Nacional de Cancerología (INC)

En el INC las infecciones fúngicas asociadas a levaduras ocupan el tercer lugar dentro de los aislamientos microbiológicos, después de los cocos Gram positivos y de los bacilos Gram negativos. Las infecciones asociadas a los hongos miceliales aún siguen siendo de difícil diagnóstico según datos epidemiológicos obtenidos de los grupos de infectología y microbiología.

5.6 Diagnóstico de laboratorio de las micosis por hongos levaduriformes

El diagnóstico tradicional de las micosis por hongos levaduriformes se basa en la observación directa, el cultivo y la serología. El cultivo de la muestra clínica es el método más utilizado en diagnóstico de las micosis (Anexo 4), ya que una vez aislado el hongo puede realizarse la identificación a nivel de especie un avance importante en la identificación de los hongos levaduriformes son los medios diferenciales ya que permiten la identificación por el color y morfología de las colonias (Anexo 6). Para el diagnóstico serológico se utiliza la detección de diversos componentes fúngicos que se liberan durante la infección (Figura 1) y de la respuesta de anticuerpos que se produce contra ellos. (Anexo 3).

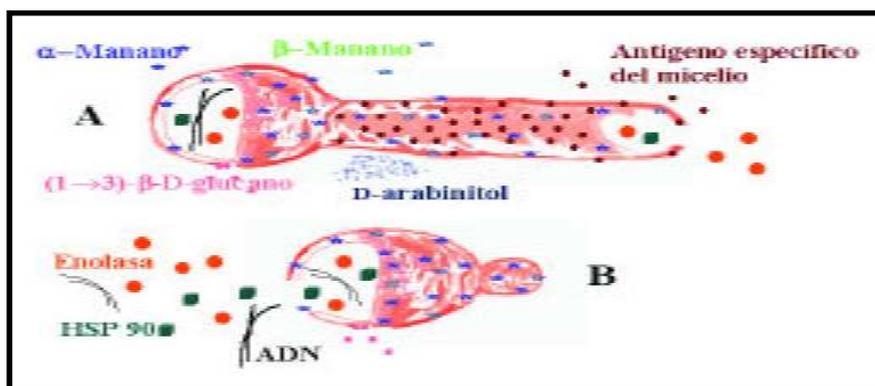


Figura 1. Principales componentes del micelio (A) y la levadura (B) de *C. albicans* de utilidad en el diagnóstico serológico de la candidiasis invasora. [2]

Aunque se han realizado muchos estudios para el diagnóstico temprano de las micosis por levaduras mediante la detección de componentes fúngicos, antígenos y anticuerpos, no se han producido avances significativos en los últimos años.

Prácticamente todos los estudios sobre detección de antígeno en pacientes con CI se realizan en la actualidad con la prueba Platelia® *Candida* Ag. [3] Esta prueba es un ELISA que detecta manano, el antígeno mayoritario de la pared celular de *Candida spp*, que debe ser liberado de su unión con los anticuerpos anti-manano para poder ser detectado en el suero de los pacientes. La liberación del manano de los inmunocomplejos que forma con los anticuerpos, es probablemente el paso más crítico de la prueba de detección y, junto con la transitoriedad de la mananemia, son los responsables de la baja sensibilidad de la prueba. [3]

Dado que el Platelia® *Candida* Ag detecta residuos de manosa unidos por enlaces α (α -Man), la combinación de esta prueba con un ELISA que detecta residuos de manosa unidos por enlaces β (β -Man) permite aumentar la sensibilidad diagnóstica, ya que ambos antígenos tienen cinéticas de aclaramiento diferentes [2].

La mayoría de los trabajos en los que se detectan antígenos de *Candida* con fines diagnósticos se han realizado en combinación con la detección de anticuerpos. [6]

5.7 Técnica de ELISA para detección de antígenos de manano.

El ELISA para la detección de antígenos de manano de *Candida* es una técnica enzimática que permite la detección de antígenos en una muestra de sangre o fluido corporal del paciente [3].

En el caso de la técnica para detección del antígeno manano se utilizará un tipo de ELISA denominado **Tipo Sándwich (Figura 4)**, donde el anticuerpo

monoclonal (Acm) de rata, EBCA-1, está dirigido contra los α 1-5 oligomanosidos de *Candida spp.* Los valores menores 0.250 ng/ml se interpretan como negativo, valores entre 0.250 - 0.500 ng/ml es intermedio y valores superiores a 0.550 ng/ml son resultados positivos. (Anexo 3).

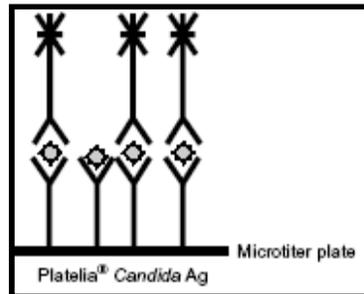


Figura 2. Detección de los antígenos por los anticuerpos mediante la técnica Platelia® *Candida Ag*.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar la utilidad clínica de la detección del antígeno de manano en pacientes oncológicos para el diagnóstico de Candidiasis Invasiva.

6.2 Objetivos específicos

6.2.1 Determinar el valor diagnóstico de la técnica de manano.

6.2.2 Describir las características demográficas y los factores de riesgo asociados a pacientes con *Candida*.

7 METODOLOGÍA

7.1 Tipo de estudio

Este estudio, es de tipo prospectivo de pruebas diagnosticas en el que se realiza la prueba de detección de antígeno de manano para diagnostico de candidiasis invasiva por un método inmunoenzimático durante el periodo del estudio.

7.2 Hipótesis

¿Qué utilidad tiene la técnica de la detección de manano en el diagnóstico de candidiasis invasiva?

7.3 Definición de sujetos en estudio

7.3.1 Población

POBLACIÓN BLANCO: Pacientes que ingresan al área de hospitalización en el Instituto Nacional de Cancerología entre los periodos de enero a julio del año 2009.

POBLACIÓN DE ESTUDIO: Pacientes de la población blanco atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología que por su estado febril, tienen orden médica de toma de hemocultivos y adicionalmente se les toma una muestra de sangre para realizar la prueba de detección de antígeno de manano para *Candida* durante el periodo del estudio.

7.3.2 Muestra

De un total de 1156 pacientes hospitalizados, 227 pacientes en el INC cumplieron con los criterios de elegibilidad durante el periodo de estudio de enero a julio del año 2009, que presentaban títulos por encima de 0.500 ng/ml y por debajo de 0.250 ng/ml.

7.3.3 Criterios de elegibilidad

- Para la realización de este estudio se tienen en cuenta los siguientes criterios:

7.3.3.1 Criterios de inclusión

- Pacientes que ingresen al INC y presenten al menos una de las siguientes condiciones:
 1. Con alto riesgo de infección fúngica invasiva según los criterios establecidos por la EORTC.(anexo1).
 2. Con sospecha de infección fúngica invasiva y que se encuentran incluidos en el sistema de vigilancia activa institucional.
 3. A los que se haya ordenado la toma de de hemocultivos, por su síndrome febril, y adicionalmente se les tome una muestra de sangre, para la detección sérica del antígeno de manano.

7.3.3.2. Criterios de exclusión

- Pacientes ambulatorios.
- Pacientes a quienes no se les tome la muestra para hemocultivo.
- Paciente a quien se le toma hemocultivo pero no la muestra de sangre.

Este estudio cumplió con las recomendaciones generadas por el comité de Vigilancia de infecciones intrahospitalarias y del grupo de Investigación clínicas del INC.

7.4 Técnica

La detección del antígeno de manano de *Candida*, es una técnica inmunoenzimática, de tipo sándwich en microplaca, que permite la detección cuantitativa o cualitativa del antígeno circulante en sueros humanos.

7.5 Procedimiento (ver anexo 3)

7.5.1 Recolección de Muestras (ver anexo 7)

7.6 Administración de los datos de investigación y análisis estadístico

Para el registro de las historias clínicas que fueron recogidas durante el periodo de estudio, se diseñó una base de datos en formato Access; para el análisis de los datos se efectuó una exportación de los mismos en el programa Stata 9.2 ®. Dicho programa efectuó la rotulación, la recodificación y el análisis de las variables.

La descripción de los datos se realizó utilizando medidas de frecuencia y porcentajes; la asociación entre variables se evaluó calculando la razón de odds (OR) y sus respectivos intervalos de confianza al 95 %,

Para el análisis multivariado se realizó un proceso de regresión logística binomial; las características operativas de la pruebas diagnosticas (sensibilidad, especificidad y valores predictivos) se estimaron con un intervalo de confianza de 95 % utilizando el modulo "DIAGT " del programa Stata 9.2®. Las pruebas de hipótesis se efectuaron con un nivel de significación del 5 %.

8 RESULTADOS

8.1 Pacientes en estudio

En este estudio, de un total de 1156 pacientes hospitalizados entre el periodo de enero a julio, 227 pacientes cumplieron con los criterios de elegibilidad establecidos. Se excluyen de este estudio aquellos pacientes cuyos títulos fueron considerados intermedios (0.250-500 ng/ml), ya que esos títulos, generan controversia en su interpretación, que será el punto de partido del siguiente estudio, por recomendación directa. [6]

8.2 Variables diagnosticas

8.2.1 Hemocultivo y agentes etiológicos aislados

Durante el periodo de estudio, nueve de los pacientes, tuvieron hemocultivos positivos para *Candida spp.* , *C. albicans* fue la especie más frecuente (ver tabla 3).

AGENTE ETIOLÓGICO	N	%
<i>C.albicans</i>	3	33.33
<i>C. tropicalis</i>	2	22.22
<i>C. krusei</i>	1	11.11
<i>C. parapsilosis</i>	1	11.11
<i>C. guilliermondi</i>	1	11.11
<i>C. lusitaniae</i>	1	11.11

Tabla 3. Agentes etiológicos aislados a partir de hemocultivos.

8.2.2 Detección del antígeno de manano

En este estudio, se seleccionó el título antigénico, de acuerdo a los parámetros establecidos para este estudio (ver anexo 3). Seis de los títulos fueron considerados como positivos (ver tabla 4).

DETECCIÓN ANTÍGENO DE MANANO	N	%
Negativos	221	97.35
Positivos	6	2.64

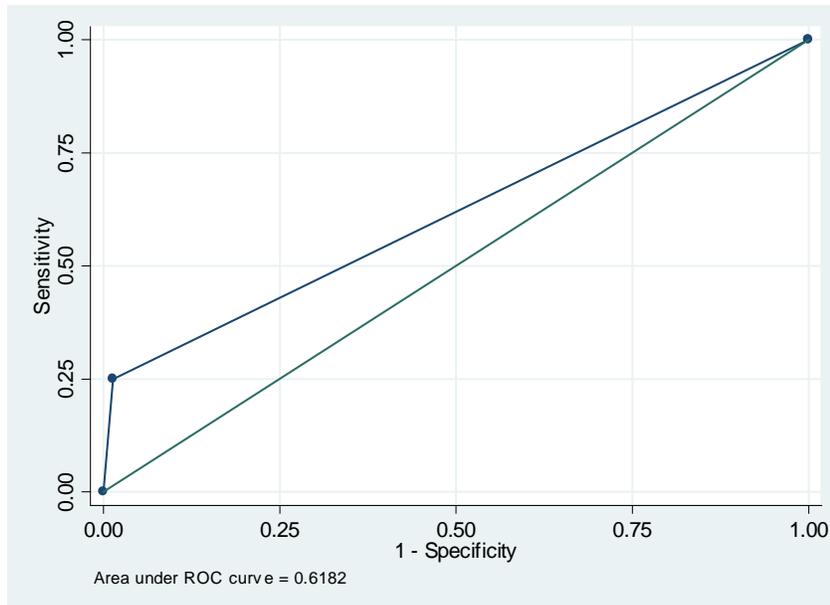
Tabla 4. Detección del Antígeno de Manano, en los pacientes en estudio.

Al evaluar las características operativas de la técnica, se halló una sensibilidad (S) del 62% Y una especificidad (E) del 98.6% (ver tabla 5).

CO	%	IC 95%
S	62	3.19 - 65.1
E	98.6	96.1 - 99.7
VPP	40	5.27 - 85.3
VPN	97.3	65.1 - 94.2

Tabla 5. Características operativas de la técnica.

De la misma forma, la curva ROC, demostró la relación entre la sensibilidad y especificidad de la prueba antigénica. (Ver grafica 1).



Grafica 1. Curva ROC para detección del antígeno de manano.

8.3 Variables clínicas

8.3.1 Descripción variables demográficas, enfermedad neoplásica de base y factores de riesgo para Candidemia.

Del total de pacientes, 49 fallecieron, donde la mortalidad global, durante el periodo de estudio, fue del 21,58%

En este estudio, la mayoría de pacientes fueron adultos, (n= 171, 75,3%), 114 fueron del sexo femenino, y 113 del sexo masculino. En relación a su patología oncológica, 111 (48,89%) tenían un diagnóstico de Tumor sólido y 116 (51.10%), un Tumor hematológico. La Leucemia Linfoide Aguda fue el tumor hematológico más frecuente (n= 44, 37,61%). (Ver tabla 6)

TUMOR HEMATOLOGICO	N	%
Leucemia linfoide aguda	44	37,61
Leucemia mieloide aguda	20	17,09
Linfoma de no Hodking	20	17,09
Leucemia linfoide crónica	4	3,42
Leucemia mieloide crónica	3	2,56
Otras neoplasias hematolinfoides*	25	33,58
TOTAL	116	100

* Mieloma Múltiple (n=8), Linfoma Hodking (n=7), Linfoma de Burkit (n=8), Anemias (n=2)

Tabla 6. Tumores hematológicos de los pacientes en estudio.

En Cuanto a los tumores sólidos, el Cáncer de Cérvix (14,41%, n=16), y el Cáncer de Colon (12,61%, n=14), fueron los más frecuentes. (Ver tabla 7)

TUMOR SÓLIDO	N	%
Cerviz	16	14,41
T. colon	14	12,61
T. huesos	10	9,01
T. Mama	9	8,11
T, cerebro	7	6,31
Otro *	55	49,51
TOTAL	111	100

T Testículo (n=6), T: próstata (n=6), T.estómago(n=10), T. laringe (n=2)
T. Ovario (n=2) T. blandos (n=8) Piel (n=2) T. renal (n=6) T. hígado (n=6)
T. cerebelo (n=1) T.Órganos digestivos (n=6)

Tabla 7. Tumores sólidos de los pacientes en estudio.

8.3.2 Factores de riesgo

La presencia de un catéter intravenoso (74.44 %), y la Administración de corticosteroides fueron los factores de riesgo más frecuentes (ver tabla 8).

FACTOR DE RIESGO	N	%
Catéter intravenoso	169	74.44%
Administración de Corticoesteróides	114	50.22%
Antecedente de cirugía	68	29.95%
Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica	46	21.10%
Diabetes Mellitus	33	15.00%
Enfermedad Vascular	27	12.74%
Infección de HIV	26	11.45%
Estancia en UCI	25	11.01%
Choque séptico	8	3.52%

Tabla 8. Factores de Riesgo de los pacientes en estudio.

Dentro del estudio se observó que solo tres factores de riesgo (Estancia en UCI, SRIS y Choque Séptico), fueron estadísticamente significativos (ver tabla 9).

Con el fin de buscar si había una asociación entre un factor de riesgo presente y el desarrollo de Candidemia, se calcularon los OR (Tabla 9).

FACTOR ASOCIADO	OR	P> z	IC 95 %
Antecedente de cirugía	3.322	0.038	1.069 - 10.321
Infección con HIV	0.714	0.366	0.345 - 1.480
Estancia en UCI	6.310	0.012	1.494 - 26.639
Diabetes Mellitus	1.015	0.968	0.479 - 2.149
Administración de Corticosteroides	7.392	0.063	0.894 - 61.087
SRIS	6.845	0.010	1.574 - 29.752
Catéter intravenoso	1.039	0.904	0.552 - 1.957
Choque séptico	5.656	0.029	1.192 - 26.818

Tabla 9. Calculo de OR de las variables asociadas a factores de riesgo.

Se estableció que la estancia en UCI (OR 6.31), tener un diagnóstico de SRIS (OR 6.845) y Choque séptico (OR 5.65), fueron factores de riesgo asociados a la presencia de la candidiasis invasiva. La Neutropenia febril, no se considero para el estudio de OR, ya que del total de los pacientes, en 47 no se obtuvieron, datos confiables; de los 180 pacientes restantes, un 25.55 %, se encontraban neutropenicos, en el momento de la toma de hemocultivo.

8.4 Uso de antibióticos y antifúngicos

Del total de pacientes en estudio 193 tenían terapia antibiótica, donde fueron más prevalentes los pertenecientes al grupo de los betalactamicos seguido por el de los Glicopeptidos. 77 de los pacientes, fueron tratados a su vez, con terapia antifungica, los más usados fueron fluconazol y Anfotericina B. (Ver tabla 10).

VARIABLE	N	%
TIPO DE ANTIBIÓTICO		
Betalactámicos	166	86.01
Quinolonas	13	6.74
Sulfamidas	7	3.63
Quinolonas	3	1.55
Imidazoles	2	1.035
Aminoglucosidos	2	1.035
TIPO DE ANTIFÚNGICO		
Fluconazol	31	40.25
Anfotericina B	21	27.28
Nistatina	19	24.68
Voriconazol	5	6.49
Caspofungina	1	1.30

Tabla 10.Tabla de tipos de antibióticos y antifúngicos.

Finalmente se hizo una relación de los pacientes a los cuales se les aisló la levadura a partir del hemocultivo teniendo en cuenta: agente etiológico, patología, factores de riesgo, antibióticos, antifúngicos y estado vital de egreso. (Ver tabla 11).

PCTE	PATOLOGÍA ONCOLÓGICA	AGENTE ETIOLÓGICO	TÍTULO DE MANANO	FACTOR DE RIESGO	ANTIBIOTICO	ANTIFÚNGICO	ESTADO VITAL DE EGRESO
1	Tumor Sólido	<i>C. albicans</i>	>0.50	UCI SRIS Choque séptico	SI	NO	MUERTO
2	Tumor Hematológico	<i>C. guilliermondi</i>	>0.50	UCI SRIS Choque séptico	SI	SI	MUERTO
3	Tumor Sólido	<i>C. albicans</i>	>0.50	NO	SI	NO	VIVO
4	Tumor Hematológico	<i>C. albicans</i>	>0.50	SRIS	SI	NO	VIVO
5	Tumor Sólido	<i>C. tropicales</i>	>0.50	NO	SI	SI	VIVO
6	Tumor Sólido	<i>C. parapsilopsis</i>	≤0.250	UCI Choque séptico	SI	SI	VIVO
7	Tumor Sólido	<i>C. lusitaniae</i>	≤0.250	UCI SRIS	SI	SI	VIVO
8	Tumor Sólido	<i>C. tropicales</i>	>0.50	UCI SRIS Choque séptico	SI	SI	MUERTO
9	Tumor Hematológico	<i>C. krusei</i>	≤0.250	SRIS Choque séptico	SI	SI	VIVO

Tabla 11. Relación de pacientes con aislamiento positivo a partir del hemocultivo

9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El diagnóstico de la EFI, producida por especies de *Candida spp*, en pacientes oncológicos continua siendo un reto, a pesar de los avances tecnológicos, en el tema. [6] La detección de antígenos fúngicos puede permitir un diagnóstico temprano de las micosis invasivas ya que, a diferencia de la detección de la respuesta de anticuerpos, no necesita el tiempo de inducción de la respuesta inmune y su detección no se ve influenciada por el estado inmunológico del paciente. [16] Pontón y colaboradores [2], afirman que la sensibilidad diagnóstica de la prueba antigénica para manano es del 90% y la especificidad del 95%, con un Valor Predictivo Positivo del 79% y Valor Predictivo Negativo del 97%, nuestro estudio fue comparable a nivel operativo, cuando consideramos las especies de *C. albicans* y *C. tropicalis*. Sin embargo, basados en los resultados, en que se incluían todos nuestros aislamientos, la sensibilidad y el Valor Predictivo Positivo fue muy bajo (ver tabla 5), porque por condicionamiento especie-específica, las especies que tienen niveles bajos de Manano, su detección o es muy baja o es negativa (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*), lo que hace que esta prueba antigénica sola, pueda ser una herramienta útil comparable con el uso de la toma hemocultivos en nuestra población de pacientes, sobre todos en aquellos con un diagnóstico de Tumor sólido, que presenten síntomas de un proceso infeccioso o este hospitalizados en UCI, y según recomienda Sendid Boualam y colaboradores, se podría obtener, mejores resultados, si se hace uso de la técnica en combinación con la determinación de títulos de ACS de manano.

Según el fabricante, esta técnica tiene una buena sensibilidad para *C. albicans* (60.3%) y para *C. tropicalis* (70%), y para especies como *C. krusei* y *C. glabrata* su sensibilidad es de apenas de 20%. [3], Con nuestros resultados, en donde se obtuvieron 9 hemocultivos positivos para levaduras, solo 6 de estos pacientes presentaron títulos de manano positivos >0.50 ng/ml, donde los 3 títulos restantes negativos, fueron asociados a especie-específica (*C. krusei*, *C. parapsilopsis* y *C. glabrata*), aún cuando el paciente presentaba síntomas

de EFI, tuviera el factor de riesgo asociado, y aun cuando ya se había aislado el agente etiológico del hemocultivo. En nuestro estudio, no establecimos si hubo algún nivel de diagnóstico que precediera, a la presencia de síntomas de EFI, o aislamiento a partir de hemocultivo, porque no se obtuvo ningún título positivo anterior al aislamiento del agente, aunque se demostró en nuestro caso que si están directamente relacionados, los títulos simultáneos al aislamiento. Y por lo controvertido de la interpretación, no se estudiaron aquellos pacientes cuyos títulos fueron considerados intermedios [2]

Las infecciones invasivas por levaduras oportunistas han contribuido significativamente a la morbilidad y la mortalidad asociada con el tratamiento potencialmente curativo para neoplasias malignas hematológicas. Muchos factores de riesgo han sido identificados y rastreados lo que permiten al clínico predecir la probabilidad de aparición de este tipo de infecciones. Un diagnóstico eficiente, consiste entre otras cosas, en mantener un alto índice de sospecha basado en la comprensión de las circunstancias clínicas en las que las infecciones fúngicas invasivas se producen. [9] La detección del antígeno de manano, es una técnica diagnóstica para la CI que podría ser de utilidad en pacientes con cáncer, especialmente en pacientes hematológicos; ya que estos presentan factores de riesgo asociados debido a la deficiencia de los linfocitos T y al uso de droga quimioterapéutica como lo menciona la mayoría de los autores en la bibliografía relacionada [12].

Basados en nuestros resultados, podemos decir que; la leucemia linfocítica aguda es más frecuente con 37.61%, la población más afectada es la adulta con un 75.3%, a diferencia de lo mencionado en el artículo de Bow y colaboradores [9], que reportan que patología hematológica más frecuente es la Leucemia Mieloide (con un 69%).

En nuestros análisis, no solo los pacientes hematológicos presentaron factores de riesgo de CI, sino también los asociados a tumores sólidos con una frecuencia de 56%, siendo esta una población significativa. [6-9,15]

De acuerdo a la base de datos y al análisis de los factores de riesgo de la población total, solo tres estuvieron relacionados con la CI estos fueron: estancia en UCI 15 %, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica 21.1 % y choque 12.74 %, siendo estas variables significativas individualmente pero al realizar el cálculo de estos factores en conjunto no aumentan la probabilidad de adquirir esta infección. A diferencia de lo que indica en el artículo Papas y colaboradores [1], donde encontraron como factores de riesgo asociados el antecedentes quirúrgicos, el uso de catéter y administración corticosteroides [7,10].

Si se encontró, que existía una relación, de los nueve pacientes con aislamiento de la levadura, a partir del hemocultivo, y los títulos antigénicos positivos presentes, sin embargo, mas asociado a un diagnostico de tumor sólido. Con la característica de resaltar, que en aquellos pacientes, con un antecedente quirúrgico, con diagnóstico de un proceso infeccioso, o factor de riesgo de EFI, o que se encuentren, hospitalizados en la UCI, con la relación etiológica especie-específica, la prueba de Manano de *Candida* tiene una utilidad real, para el diagnostico de la CI.

Aunque el uso de terapia antibiótica o antimicótica, para tratamiento tanto empírico, como dirigido es considerado un factor predisponente para la CI, la presencia de los mismo en nuestros pacientes, no se estableció como un factor asociado, a un diagnostico infeccioso, o en el caso contrario a un posible falso negativo. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido la utilidad de esta prueba antigénica como una herramienta para el inicio de una terapia antifúngica anticipada.

10 CONCLUSIONES

La detección de manano mediante la prueba PLATELIA™ CANDIDA Ag, puede ser considerada en nuestra población de pacientes oncológicos, con la consideración de la característica especie-específica

Los hemocultivos siguen siendo hasta el momento, la herramienta más útil, que nos permite el aislamiento del agente etiológico causante de la candidemia y el diagnóstico de la EFI, en nuestra población.

El uso de la medición de los títulos antigénicos, y específicamente de Manano de Candida, en nuestra población de pacientes, puede tener un mayor valor diagnóstico, y un diagnóstico que se anticipe a su aislamiento a partir de hemocultivos, en aquellos pacientes con signos y síntomas de un proceso infeccioso, o que tengan antecedentes quirúrgicos, o se hallen hospitalizados un ICI. Sin embargo, hay que determinar el valor real de uso de esta prueba de estos pacientes de acuerdo a su patología oncológica (Tumores hematológicos vs Tumores sólidos)

11 RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir programas de vigilancia para el seguimiento de los pacientes oncológicos con riesgo de EFI.

Se sugiere realizar una socialización y evaluación continua de todo el personal de la institución para la toma y recolección de las muestras para futuros estudios.

Para futuras investigaciones la recolección de datos debe ser más específica, para facilitar el análisis y estudio de resultados.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Papas G. Peter. Invasive Candidiasis. Infect Dis Clin N Am. 2006. 20: 485-506
2. Pontón José y Palacio del Amelia. Avances y limitaciones del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por levaduras. Revista Iberoamericana de micología . 2007. 24: 181-186
3. Platelia™ *Candida Ag.* Detección del antígeno manano de *Candida* en suero por el método inmunoenzimático. BIO RAD.
4. Palmieri Omar J. Enfermedades infecciosas. Mc-Graw Hill (ed.) 2005. 368-375.
5. Ausina Vicente. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Medica Panamericana S.A. (ed.). 2006. 617-624.
6. Prella Maura, Bille Jacques, Pugnale Mauron *et al.* Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. Diag Microb and infectious disease. 51 (2005) 95-101.
7. Brahm H, Bow Eric J., Menichetti Francisco *et al.* Fungal infections in nontransplant patients with hematologic malignancies. Infectious Diseases Clinics of North America. 16 (2002) 935-964.
8. Barnes Penelope, Kieren A. Marr *et al.* Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoeitic stem cell transplant recipients. British Journal of Hematology. 139 (2007) 519-531.

9. Bow J. Eric Considerations in the approach to invasive fungal infection in patients with hematological malignancies. *British Journal of Haematology*. 140 (2008) 133-152.
10. Cheng Ming-Fang et al. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. *BMC Infectious Diseases*. 2005. Page 1-5.
11. Sendid Boualamed *et al.* Combined detection of mannanemia and anti-mannan antibodies as strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J. Med. Microbiology*. vol 51 (2002) 433-442.
12. Sendid Boualem, Caillot Denis, Baccouch –Humbert Benedicte, *et al.* Contribution of the platelia candida-specific antibody and antigen test to early diagnosis of systemic *candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (2003), 4551-4558.
13. Ellepola Arjuna, Morrison Christine. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The Journal of Microbiology* . 43 (2005), 65-84.
14. Safdar , A. Strategies to enhance immune function in hematopoietic transplantation recipients who have fungal infections. *Bone Marrow Transplantation*. 38(2006) 327-337.
15. Franquet Tomas, Gimenez Ana, Hidalgo Alberto. Imaging of Opportunistic fungal infections in Immunocompromised patient. *European Journal of Radiology*. 51 (2004), 130-138.
16. Pontón, José . Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Revista Iberoamericana de micología* . 2007. 24: 181-186

13 ANEXOS

ANEXO 1

Definiciones para las infecciones fúngicas invasivas en pacientes con cáncer y receptores de trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas. (4).

Categoría, tipo de infección	Descripción
Infección fúngica invasiva Probada Daño de tejido infectado Miceliales ¹ m	Examen histopatológico o citopatológico de muestras como lavado broncoalveolar, biopsias, evidenciando hifas o tejido dañado, cultivo positivo obtenido de muestras estériles, signos clínicos o radiológicos anormales consistentes con la infección.
Levaduriformes ¹	Examen histopatológico o citopatológico de muestras como aspirados, biopsias, excluyendo membranas mucoides, evidenciando células levaduriformes (especies de <i>Candida</i> la mayoría mostrando pseudohifas o hifas verdaderas) cultivo positivo obtenido de muestras estériles, signos clínicos o radiológicos anormales consistentes con la infección.
Fungemia Miceliales ¹	Hemocultivo positivo, acompañado de signos y síntomas clínicos compatibles con la revelación del microorganismo.
Levaduriformes ¹	Hemocultivo positivo para <i>Candida</i> u otras levaduras, acompañado de signos y síntomas clínicos compatibles con la revelación del microorganismo.
Infección fúngica endémica ²	Cultivo probado del sitio afectado con síntomas atribuidos a la infección fúngica, cultivo con resultado negativo, en examen histopatológico evidencia microscópica de hongos dimórficos (<i>Blastomyces</i> , <i>Coccidioides</i> y especies de <i>Paracoccidioides</i>)
Diseminado	Hemocultivo positivo o detección antigénica positiva.
Infección fúngica invasiva probable	Por lo menos 1 criterio de alto riesgo (Tabla 2); 1 criterio microbiológico y 1 criterio clínico mayor (o menor) anormal, consistente con la infección.
Infección fúngica posible ³	Por lo menos 1 criterio de alto riesgo; 1 criterio microbiológico ó 1 criterio clínico mayor o menor anormal, consistente con la infección.

¹ Identificación del género y especie por medio del cultivo.

Tabla 2. Criterios de alto riesgo, microbiológicos y clínicos para infecciones fúngicas invasivas en pacientes con trastornos hematológicos y trasplante de medula ósea. (4) criterios EORTC

Tipo de criterio	Criterio
Alto Riesgo	Neutropenia (<500 neutrófilos/mm ³ por 10 días) Fiebre persistente >96 h en pacientes con alto riesgo y que están siendo tratados con antibiótico de amplio espectro. Temperatura corporal >38 ^o C ó <36 ^o C, con factores predisponentes; neutropenia prolongada mayor de 10 días, administración de agentes inmunosupresores en 30 días previos, es un índice de infección fúngica invasiva probable o posible en un episodio de neutropenia, o coexistente con SIDA. Prolongado uso de corticosteroides (>3 SEM) en los anteriores 60 días.
Microbiológicos	Cultivos positivos para hongos miceliales (aislando gérmenes como <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> o algunas especies de Zygomycetos) o de muestras como esputo, lavado broncoalveolar. Evidencia microscópica de morfología compatible con hongos miceliales, obtenida del germen aislado en el cultivo. Evidencia microscópica de morfología compatible con especies de <i>Criptococcus</i> en muestras como esputo o lavado broncoalveolar. Títulos antigénicos positivos para <i>Aspergillus</i> en lavado broncoalveolar, LCR o 2 muestras serológicas seriadas positivas. Títulos antigénicos positivos para <i>Criptococco</i> en sangre. Evidencia microscópica directa para elementos fúngicos en muestras estériles. Títulos antigénicos positivos para <i>Histoplasma Capsulatum</i> , en suero, orina o LCR. Dos urocultivos positivos para <i>Candida</i> . Hemocultivos positivos para especies de <i>Candida</i> .
Clínicos	
Infeción del tracto respiratorio bajo	
Mayor	Nuevos infiltrados observados en la Tomografía Axial Computarizada.
Menor	Síntomas indicativos de infección en el tracto respiratorio bajo, (tos, dolor en el pecho, disnea)
Sino nasal infección	
Mayor	Evidencia sugestiva radiológica de infección fúngica invasiva en sinuses (erosión o extensión en las paredes sinusales evidente de infección)
Menor	Síntomas respiratorios (congestión nasal), ulceraciones nasales, epistaxis, hinchazón periorbital, lesiones necróticas o perforación

Infección del Sistema Nervioso Central Mayor	en el paladar. Evidencia radiológica sugestiva de una infección en el SNC (mastoiditis u otros focos infecciones, enfisema extradural).
Menor	Signos y sintomatología menor de foco Neurológico, cambio mental, irritación Menígea, anormalidades en la bioquímica y celularidad del LCR (con cultivo negativo en LCR y negativo para malignidades).
Diseminación de la infección fúngica	Diseminación papular o nodular, provocando Lesiones.
Diseminación crónica de candidiasis	Abscesos pequeños, periféricos, en hígado y/o Bazo demostrado por un TAC, ultrasonido, elevación sérica de los niveles de fosfatasa alcalina. También soportado por un criterio microbiológico.

ANEXO 2

TOMA DE HEMOCULTIVOS

A. Sangre obtenida a través de punción periférica

CUIDADOS Y RECOMENDACIONES

- Realizar lavado de manos quirúrgico.
- Mantener técnica aséptica durante todo el procedimiento.
- Utilizar campo estéril para evitar tener contacto con áreas circundantes que ofrezca el riesgo de contaminación.
- Colocar mascarilla al paciente.
- Realizar antisepsia de la zona a puncionar; no palpe la vena sin guantes estériles una vez preparada la piel.
- Utilizar otros guantes estériles para cada punción.
- No cambiar la aguja para envasar la sangre en los frascos colectores.
- En pacientes que están recibiendo tratamiento antibiótico, recolectar las muestras en botellas con resina.
- Se debe mantener una dilución en las botellas de hemocultivos de 1:5 para pacientes pediátricos y 1:10 para pacientes adultos de acuerdo con la recomendación del fabricante.
- Para buscar micobacterias es necesario tomar la muestra y colocarla en heparina; se recomienda tomar muestra durante dos días.
- Colocar la muestra en botella con rótulo específico para cultivos de hongos. No se recomienda obtener muestras mediante punción arterial porque la tasa de recuperación de microorganismos es baja [2, 11].

TÉCNICA DE RECOLECCIÓN

- Limpiar el tapón del frasco colector con alcohol al 70% antes de puncionar para envasar la muestra.
- Obtener 8 a 10 c.c. de sangre para cada frasco en pacientes adultos.
- Obtener cada muestra de sitios anatómicos diferentes y con un intervalo de 10 a 15 minutos.
- Para la detección de microorganismos en sangre en sospecha de bacteriemia se recomienda recolectar entre 20 y 40 mL de sangre (2 a 4 botellas de hemocultivos). En sospecha de endocarditis pueden ser suficientes 20 mL de sangre (2 botellas de hemocultivos).
- En sospecha de bacteriemia a mayor volumen recolectado, mayor la probabilidad de recuperación microbiológica [12]. En pacientes pediátricos el volumen de los hemocultivos se ajusta de acuerdo a la edad:
 - Prematuros extremos (menos de 1000 gr) 0,5 mL.
 - Neonatos hasta 1 mL.
 - Lactantes y niños hasta 6 años 2-3 mL.
 - Mayores de 6 años 5-10 mL.

El número de botellas a tomar depende de la situación clínica en pacientes pediátricos:

- En prematuros extremos (menos de 1.000 gr) 2 botellas.
- Sospecha de bacteriemia: 2 botellas.
- Sospecha de endocarditis 4-6 botellas (a tomar entre 6 y 24 horas)

EQUIPO

- Bata y campos estériles.
- Gorro y mascarilla con protección ocular.
- Guantes estériles.
- Equipo de asepsia (antiséptico, gasas y guantes estériles).

- Frascos para hemocultivos. Frascos para hemocultivos con rótulo específico para hongos.
- Jeringas estériles.

TRANSPORTE

- Se recomienda en los primeros 15 minutos de la recolección a temperatura ambiente. De 15 días a dos meses hongos miceliales.
- Para levaduras de acuerdo con el tiempo de positividad del microorganismo puede crecer en las primeras 24 horas.

B. Sangre obtenida a través de catéter venoso central

CUIDADOS Y RECOMENDACIONES

- Realizar lavado de manos quirúrgico.
- Mantener técnica aséptica durante todo el procedimiento.
- Utilizar campo estéril para evitar tener contacto con áreas circundantes que ofrezca el riesgo de contaminación.
- Colocar mascarilla al paciente.
- En pacientes que están recibiendo tratamiento antibiótico, recolectar las muestras en botellas con resina.
- Realizar desinfección del trayecto y sitio de conexión de equipos de infusión al catéter.
- Utilizar la vía proximal para la obtención de la muestra en catéteres multilúmenes.
- No se recomienda tomar muestras a través de catéteres arteriales, porque aumenta la posibilidad de contaminación.

TÉCNICA DE RECOLECCIÓN

- Limpiar el tapón del frasco colector con alcohol al 70% antes de puncionar para envasar la muestra.
- Extraer 10 c.c. de sangre para limpiar la vía y desecharlos.
- Con otra jeringa obtenga 10 c.c. más de sangre y déjelos a un lado por un momento.
- Utilice otra jeringa para extraer 10 c.c. de sangre y envasar en el frasco de hemocultivo.
- Retornar los 10 c.c. de sangre que había guardado temporalmente, previa verificación de ausencia de coágulos.
- Obtener 8 a 10 c.c. de sangre para cada frasco en pacientes adultos.

EQUIPO

- Bata y campos estériles.
- Gorro y mascarilla con protección ocular.
- Guantes estériles.
- Equipo de asepsia (antiséptico, gasas y guantes estériles).
- Frascos para hemocultivos.
- Jeringas estériles.

TRANSPORTE

Se recomienda en los primeros 15 minutos de la recolección a temperatura ambiente.

C. Pacientes con sospecha de infección de torrente sanguíneo relacionada con catéter venoso central

CUIDADOS Y RECOMENDACIONES

En bacteriemia asociada a catéter en pacientes adultos y pediátricos se debe tomar una botella de hemocultivo de sangre periférica y uno de sangre obtenida a través del catéter [15, 16].

TÉCNICA DE RECOLECCIÓN

Obtenga 10 c.c. de sangre periférica y 10 c.c. de sangre del catéter.

EQUIPO

- Bata y campos estériles.
- Gorro y mascarilla con protección ocular.
- Guantes estériles.
- Equipo de asepsia (antiséptico, gasas y guantes estériles).
- Frascos para hemocultivos.
- Jeringas estériles.

TRANSPORTE

Se recomienda en los primeros 15 minutos de la recolección a temperatura ambiente.

ANEXO 3

PLATELIA™ CANDIDA Ag® Bio Rad

Es una técnica inmunoenzimática en un tiempo de tipo sándwich en microplaca, que permite la detección cuantitativa o cualitativa del antígeno de manano circulante en sueros humanos. El anticuerpo monoclonal (Acm) de rata, EBCA-1, dirigido contra los α 1-5 oligomanosidos de *Candida* spp.

Composición del kit

ETIQUETADO		NATURALEZA DE LOS REACTIVOS	PRESENTACION
R1	Microplate	Microplaca: 12 tiras de 8 pocillos sensibilizados con el anticuerpo monoclonal EBCA-1 antimanano.	1
R2	Concentrated Washing Solution	Solución de lavado concentrada: tampón TRIS-NaCl (pH 7,4), 1% Tween 20 Conservante: 0.01 % de thimerasal	1x 100 ml
R3	Negative Control	Suero control negativo: suero humano que no contiene manano, utilizado como control negativo y como diluyente del suero patrón durante la preparación de los puntos estándares 1.0, 0.5 y 0.25 ng/ml en la prueba cuantitativa y para la preparación del suero umbral en la prueba cualitativa.	1x10 ml
R4	Calibrator	Suero patrón: suero humano que contiene 2.0 ng de manano---ml, utilizado para la preparación de los puntos estándares 2.0, 1.0, 0.5, y 0.25 ng/ml en la prueba cuantitativa y el suero umbral en la prueba cualitativa.	2 x 2 ml
R5	Positive Control	Suero control positivo: suero humano que contiene entre 0.5 y 1.5 ng de manano—ml. Conservante < 0.1% de azida sodica.	1x 2 ml
R6	Conjugate	Conjugado: anticuerpo monoclonal anti-manano marcado con peroxidasa. Conservante: 0.01 % de thimerasal	1 x 8 ml
R7	Serum Treatment Solution	Solución de tratamiento de los sueros: solución ácida de EDTA, sin conservantes.	1x 10.5 ml
R8	TMB Substrate Buffer	Tampón sustrato de la peroxidasa: solución de ácido cítrico y acetato de sodio pH5.2 que contiene 0.009% de H—o----y 4% de DmetilSulfOxido (DMSO).	1x 60 ml
R9	Chromogen: TMB Solution	Solución de cromogeno (concentrado): solución al DMSO al 90% que contiene 0.6% de tetra-metil- benzidina (TMB)	1x1 ml
R10	Stopping Solution	Solución de parada: solución de ácido sulfúrico 1.5 N	1x12 ml
		Hojas adhesivas	4

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Agitador tipo "Vortex".
- Pipetas de 50, 100, 300 y 1.000 µL.
- Agua destilada o perfectamente desmineralizada para la solución de lavado.
- Tubos Eppendorf o similares de 1,5 mL con tapones herméticos que resistan el calentamiento a 100°C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL que permita la centrifugación a 10.000g.
- Agitador para tubos.
- Contenedor para residuos contaminados.
- Baño maria con termostato a 100°C.
- Baño o estufa para incubar las muestras a 37 °C.
- Lavador de microplacas automático, semiautomático o manual.
- Lector de microplacas equipado con filtros de 450 y 620 nm.
- Hipoclorito de sodio y bicarbonato de sodio.

Procesamiento del suero

1. Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.
2. Se introducen 300 µL del suero a estudiar en un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
3. Se añaden 100 µL de la solución de tratamiento proporcionada con la prueba. Cerrar el tubo con tapón hermético.
4. En un baño con agua hirviendo sumergir el fondo del tubo durante 3 min para liberar el manano de los complejos con los anticuerpos.
5. Centrifugar a 10.000 r.p.m. durante 10 min. Retirar el sobrenadante para la detección de manano.

Respetar estrictamente las indicaciones sobre las temperaturas, puesto que es un factor esencial en la realización de la prueba.

Reacción inmunoenzimáticas

1. Establecer cuidadosamente el plan de distribución de los sueros control, de los puntos estándares (modo cuantitativo), del suero umbral 0,5 ng/ml y del punto estándar 0,25 ng/ml (modo cuantitativo) y de las muestras de pacientes
2. Sacar el marco y las tiras no utilizadas en el embalaje protector. Guardar las tiras no utilizadas en el embalaje y cerrarlo cuidadosamente.
3. Homogenizar el contenido del frasco del conjugado por inmersión antes de su utilización.
4. Distribuir sucesivamente en los pocillos 50 μ L del conjugado y 50 μ L del sobrenadante del suero tratado
5. Cubrir la microplaca con la película adhesiva apretando bien toda la superficie para garantizar la estanqueidad.
6. Incubar la microplaca en una incubadora durante 90 minutos a 37°C. Preparar la solución de lavado diluida
7. Retirar la película adhesiva, aspirar el contenido para residuos contaminados y se realizar 5 lavados.
8. Prepara la solución de revelado diluida 1/50 distribuir rápidamente, protegida de la luz rápidamente 200 μ L en todos los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Detener la reacción enzimática añadiendo 100 μ L de la solución de parada.
10. Limpiar cuidadosamente la parte inferior de las placas. Leer la densidad óptica a 450/620

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Trazado de la curva patrón

La curva patrón se realiza con los cuatro puntos estándares 2,0, 1,0 0,5 y 0,25ng/ml que se obtiene por dilución de suero patrón.

Interpretación

Concentración	Valor
Negativo	< 0.25
Intermedio	$0.25 \leq C < 0,5$
Positivo	$C \geq 0,5$

ANEXO 4

Medios de cultivo componentes y preparación.

AGAR SABOREAUD

Medio de cultivo semisintético; se utiliza de manera universal para la identificación sistémica de los diferentes agentes fúngicos.

- FÓRMULA:

Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Agar agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

- PREPARACIÓN:

Disolver el medio de cultivo con agua destilada (por cada 1000 ml de agua destilada se agregan 35 g de medio de cultivo), en un Erlenmeyer. Posteriormente se coloca en la autoclave a 121 °C durante 15 a 20 minutos, luego debe servirse en cajas de Petri.

AGAR PAPA DEXTROSA

Útil para el cultivo. Aislamiento y determinación del número de gérmenes de levaduras y mohos, a partir de alimentos y otros materiales.

- FORMULA

Infusión de papa	200g
D (+) – glucosa	20g
Agar-agar	15g
Agua destilada	1000 mL.

- PREPARACIÓN

Disolver en 1 litro de agua destilada 39g del medio en un erlenmeyer, esterilizar y en autoclave por 15 a 20 minutos a 121°C. Después de esterilizado en medio verter en cajas de petri.

ANEXO 5

Panel para la identificación rápida de levaduras walk – away -

96® microscan

Se utiliza pruebas convencionales modificadas y cromogénicas para la identificación de levaduras en muestras clínicas. El panel para la identificación de levaduras es una placa de microdilución de 96 pocillos. Se rehidratan los sustratos con una suspensión concentrada de levadura en agua esterilizada. Se obtiene la identificación después de una incubación a 35 – 37 °C durante 4 horas.

El panel para la identificación rápida de levaduras se utiliza para la identificación rápida de levaduras y especies afines aisladas de muestras clínicas.



ANEXO 6

CHROMagar *Candida*

Medio de cultivo, selectivo para el aislamiento de hongos levaduriformes tipo *Candida*.

Formula

COMPONENTES	G
Glucosa	20g
Choromopeptona	10g
Cromógeno listo	2.0g
Cloranfenicol	0.5g
Agar	15g

Según el sustrato cromogénico que sea metabolizado; por las diferentes cepas, las colonias adquieren un color que resulta característico para cada especie.

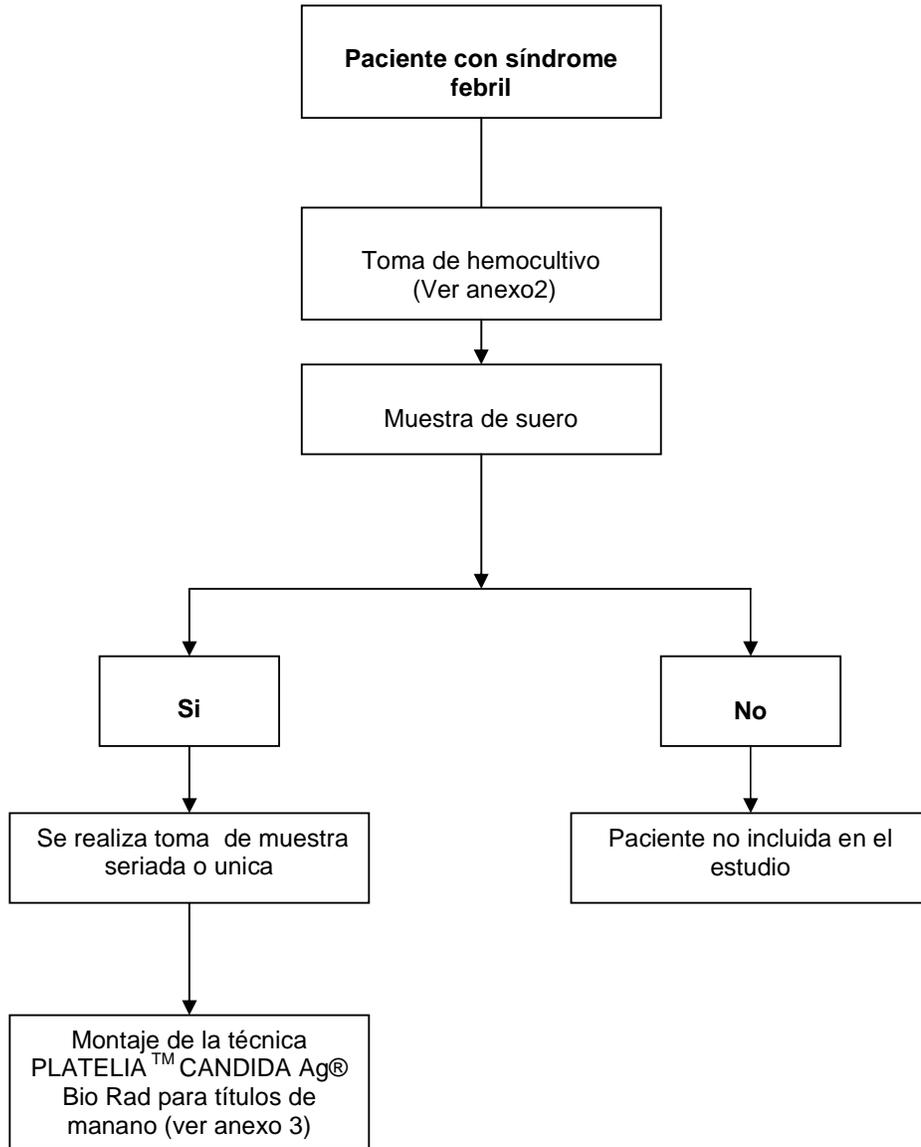
Levadura	Colonias
<i>C. albicans</i>	Verdes
<i>C. krusei</i>	Rosado pálido
<i>C. tropicales</i>	Azul metálico

ANEXO 7

Recolección de Muestras

- Verificar que el paciente cumpla con los criterios de inclusión en el estudio.
- Llenar la ficha de recolección de la información del paciente.
- Rotular adecuadamente los frascos de hemocultivos y el tubo de la muestra de sangre.
- La muestra se recolectara de la siguiente manera:
Tomar 2 hemocultivos de resina, de acuerdo a las recomendaciones del manual de toma de muestras. Tomar una muestra de sangre en tubo seco, con gel.
- Centrifugar las muestras de sangre a 3300 r.p.m. durante 10 minutos, separar el suero en un criovial para su almacenamiento posterior en refrigerador a < 40°C hasta su procesamiento.
- Ingresar los hemocultivos al sistema automatizado Bactec 9240 Becton Dickinson, con el protocolo de incubación. Ver anexo 5.
- Si el hemocultivo resulta positivo se procederá a realizar el aislamiento en agar Saboreaud ® y agar PDA® para recuperar el microorganismo.
ANEXO 4
- Montar un panel de identificación rápida de levaduras, para especificar género y especie del microorganismo. ANEXO
- Al paciente se le realizara un seguimiento bisemanal con dos muestras por semana de antigenemia.

ANEXO 8



ANEXO 9

