



Evaluación de la utilidad clínica de la prueba ELISA de detección de Ag manano de *Candida* para el diagnóstico de la candidiasis invasiva en pacientes pediátricos

Diana Evelyn Martínez-Garnica,* Marcela Jiménez-Jiménez,*
Celedonio Ramírez-Guerrero,* Briceida López-Martínez‡

Palabras clave:

Candidiasis, manano,
ELISA, valor
predictivo negativo,
hemocultivos.

Key words:

Candidiasis, mannan,
ELISA, negative
predictive value,
blood cultures.

* Laboratorio
de Micología
del Laboratorio Clínico.
‡ Subdirección
de Servicios Auxiliares
de Diagnóstico.

Hospital Infantil
de México «Federico
Gómez», México, D.F.,
México.

Correspondencia:
Diana Evelyn
Martínez Garnica
Calle 30 Núm. 8,
Col. Maravillas,
Cd. Nezahualcóyotl.
Estado de México,
57410
Tel: 57 43 08 43,
Cel. 044 55 40 90
25 99
E-mail: diana_eyv@
hotmail.com

RESUMEN

Contexto: La candidiasis invasiva (CI) es la cuarta causa de infecciones sanguíneas nosocomiales y su mortalidad asociada es mayor de 40%. Su diagnóstico basado en una técnica inmunoenzimática, permite detectar en un tiempo oportuno, el Ag manano circulante en el suero de los pacientes. **Objetivo:** Determinar la utilidad clínica de la prueba inmunoenzimática de detección de antígeno manano en suero humano en pacientes pediátricos. **Material y métodos:** Se evaluaron los parámetros analíticos de la prueba ELISA (Platelia™ *Candida* Ag®): sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, en comparación con el estándar de oro que es el hemocultivo. **Resultados:** 538 muestras de suero procedentes de 348 pacientes que cursaban con sepsis, a quienes se les realizó la prueba de detección de Ag manano. 197 muestras (36.6%) fueron positivas para Ag manano; de éstas, sólo 61 muestras (11.3%) presentaron cultivo micológico positivo y sólo 19 (3.5%) hemocultivo positivo para levaduras. La sensibilidad y especificidad de la prueba fueron 86.4 y 65.5% respectivamente, su VPP fue de 9.6% y VPN de 99.1%. **Conclusiones:** En el diagnóstico de CI, el resultado de la prueba de detección de Ag manano no debe tomarse como dato aislado, es fundamental contar con datos clínicos, cultivos micológicos y hemocultivos. Debido al alto valor predictivo negativo de la prueba (99.1%) consideramos que esta prueba ayudaría a descartar una probable CI.

ABSTRACT

Context: Invasive candidiasis (IC) is the fourth leading cause of nosocomial bloodstream infections and associated mortality is greater than 40%. Diagnosis based on an immunoenzymatic technique, allows detection at an appropriate time, the mannan antigen circulating in the serum of patients. **Objective:** To determine the clinical utility of immunosorbent assay detection of mannan antigen in human serum in pediatric patients. **Material and methods:** Analytical parameters of the ELISA test (*Candida* Platelia™ AG®) were evaluated: sensitivity, specificity, PPV, NPV, compared to the gold standard which is the blood culture. **Results:** 538 serum samples from 348 patients were enrolled with sepsis. A who underwent screening mannan Ag. 197 samples (36.6%) were positive for mannan Ag, for you, only 61 samples (11.3%) had positive mycological culture and only 19 (3.5%) blood culture positive for yeast. The sensitivity and specificity of the test were 86.4% and 65.5% respectively, the PPV was 9.6% and NPV 99.1%. **Conclusions:** In the diagnosis of IC, the result of the test for mannan Ag should not be taken as a data point, it is essential to have clinical, mycological cultures and blood cultures. Because of the high negative predictive value of the test (99.1%) consider that this test would help rule out a probable CI.

INTRODUCCIÓN

La candidiasis invasiva es la cuarta causa de infecciones sanguíneas nosocomiales y su mortalidad asociada es mayor al 40%. Las infecciones ocasionadas por *C. albicans*, predominan en la mayoría de los reportes (60-80%); sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento de casos ocasionados por especies de *Candida* no *albicans*.^{1,2}

Se han implicado diversos factores de riesgo que aumentan la probabilidad de adquirir una candidemia, entre los que se encuentran: procedimientos terapéuticos, uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro y esteroides, citotóxicos, trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas y órganos sólidos, instalación de catéteres venosos, nutrición parenteral, neoplasias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), prematurez y diabetes mellitus.

Recibido:
15/12/2014
Aceptado:
12/02/2015

La severidad de la candidemia en el paciente pediátrico depende principalmente de la incapacidad e inmadurez de su sistema inmune para limitar el proceso infeccioso, así como los factores de virulencia del hongo y de las condiciones del microambiente en que se lleva a cabo la interacción hospedero-parásito.³⁻⁵

Los signos clínicos de una candidiasis invasiva pueden ser no específicos y su diagnóstico se basa generalmente en hemocultivos; sin embargo, un aislamiento de *Candida* puede tardar de 24 a 96 horas y su recuperación es sólo en 24-60% de los casos, esto debido a su baja sensibilidad (40%). Un día de retraso en el diagnóstico y el tratamiento, se asocia a un incremento de mortalidad, especialmente en pacientes con candidemia. Por lo tanto, la identificación oportuna de una candidiasis invasiva tiene el potencial de incrementar la respuesta terapéutica antifúngica, logrando así su curación total.⁶

El manano es un polisacárido de alto peso molecular presente en 7% de la pared celular de *Candida* spp. y es uno de los principales antígenos circulantes durante la infección, que puede detectarse mediante una técnica inmunoenzimática tipo sándwich en microplaca. Esta técnica cuantitativa apoyada con los métodos micológicos convencionales (cultivos y examen directo), nos permite evaluar según los valores de corte si un paciente presenta o no una candidemia, contribuyendo así a un diagnóstico temprano y una adecuada terapia.^{7,8}

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron 538 muestras procedentes de 348 pacientes hospitalizados en los Servicios de Medicina Crítica y General del Hospital Infantil de México «Federico Gómez» entre el periodo de enero de 2011 a enero de 2013. De cada paciente se registraron datos demográficos, sala de procedencia, diagnóstico de base, fecha de la prueba de Ag manano, interpretación de la prueba, hemocultivos, especie de *Candida* aislada del hemocultivo y cultivos en placa.

Todos los aislados de pacientes fueron analizados mediante examen en fresco y aislados en Agar Sabouraud y en el medio *Candida* ID 2® (CAN2) (bioMérieux). La identificación de especie se efectuó en el sistema Vitek 2® y en la galería ID 32 C®. La detección de antígeno manano se realizó mediante la técnica ELISA del kit Platelia™ *Candida* Ag® siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente: Cada muestra, junto con el control positivo y negativo, fueron procesados en baño María de 100 °C con la solución de tratamiento del kit. Se centrifugaron y se llenaron los pozos de la placa con cada uno de los calibradores y el sobrenadante de las muestras

previamente procesadas. Se adicionó anticuerpo monoclonal antimanano marcado con peroxidasa y se dejó incubar durante 90 minutos. Se realizaron cinco lavados a la placa y posteriormente se adicionó el compuesto cromógeno y se dejó incubar durante 30 minutos, por último se agregó la solución de parado y se leyeron los resultados a una densidad óptica de 450 nm (con filtro de referencia a 620 nm). Se realizó una base de datos para el registro de los datos demográficos y clínicos de los pacientes durante el periodo de estudio. Se analizaron estadísticamente las variables mediante cuadros de contingencia. Los resultados se expresan en frecuencia y porcentaje.

RESULTADOS

De los 348 pacientes 146 (42%) correspondieron al género femenino y 202 (58%) al masculino. Las edades comprendidas fueron desde los tres días hasta los 18 años.

Los diagnósticos de base de los pacientes en estudio, fueron principalmente los de origen oncológico e infeccioso. La LLA y la LMA representaron 29.3%, los tumores sólidos 27.6%, los de origen infeccioso 21.3% y 21.8 % diversas patologías.

Los resultados de cada prueba realizada, se establecieron según los valores de corte del inserto. Las muestras con un resultado negativo para la detección del Ag, representaron el mayor porcentaje (48%), seguidas de las pruebas con resultados de Ag positivos (36.6%) y por último los resultados con Ag intermedio (15.4%) (figura 1).

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

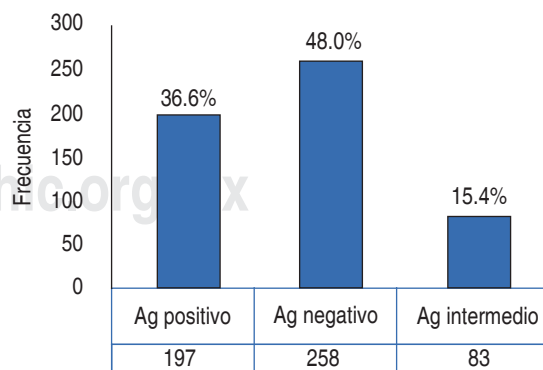


Figura 1. Resultados de la captura de Ag manano.

La población manifestó la presencia de seis especies de *Candida*. En los datos se encontró que la mayor parte de las cepas pertenecen a *C. albicans* (63.6%) y la menos frecuente *C. utilis* (0.8%) (figura 2).

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

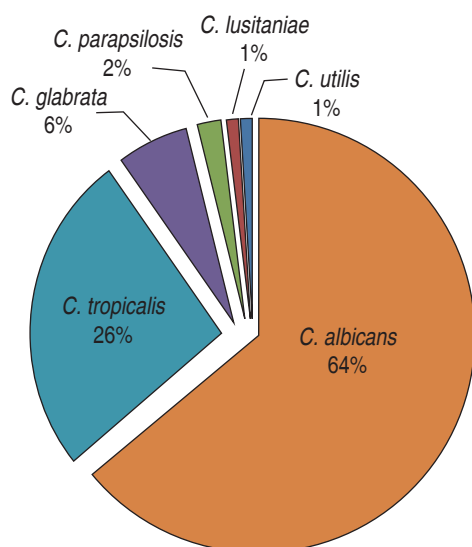


Figura 2. Tipificación de las especies aisladas de las muestras biológicas positivas.

Se realizó la correlación entre los 538 resultados de las pruebas de antígeno y los cultivos realizados (no se tomaron en cuenta los hemocultivos). Posteriormente se obtuvieron los porcentajes de cada uno de los comparativos, siendo los cultivos positivos con antígenos positivos 11.3%, cultivos negativos con antígeno negativo 18.6%; sin embargo, muchas muestras sin cultivo presentaron un resultado de antígeno negativo lo que representó 23.4% (cuadro II).

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

Se obtuvieron los parámetros analíticos de la técnica, mediante cuadros de contingencia, en donde se tomaron en cuenta tres situaciones distintas para los resultados intermedios. En cada una de ellas, los valores varían considerablemente; sin embargo, el valor predictivo negativo (VPN) de la técnica se mantiene en los tres casos (cuadro IV).

DISCUSIÓN

Las infecciones fúngicas han aumentado debido a una serie de factores, entre los que destacan el mayor número de enfermos con alteraciones del sistema inmunitario. La candidiasis invasiva tiene un efecto significativo sobre la evolución del paciente, se estima que la mortalidad atribuible a este tipo de infección es de 30 al 70%.

Uno de los mayores problemas para el diagnóstico de la candidiasis es el aislamiento del agente etiológico, ya que los cultivos microbiológicos en medio ADS no tienen un nivel de recuperación bueno (50%) y el tiempo requerido para su aislamiento (24 a 72 horas) es poco

Cuadro I. Relación entre cultivos positivos, hemocultivos y antígeno manano.

Cultivos	Muestras	Hemocultivos		Antígeno		
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Intermedio
Orina	68	9	59	39	21	8
Broncoaspirado	20	3	17	11	5	4
Cavidad oral	14	1	13	8	4	2
Otros (biopsia, líquido pleural)	8	2	6	3	2	3
Total	110	15	95	61	32	17

Cuadro II. Porcentajes de los cultivos con relación a su resultado de la prueba de antígeno.

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

Cuadro III. Porcentajes de los hemocultivos con relación a su resultado de la prueba de Ag manano.

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

Cuadro IV. Características operativas de la técnica de detección de antígeno manano.

Variable	Sin tomar en cuenta los valores intermedios (%)	Intermedios considerados como positivos (%)	Intermedios considerados como negativos (%)
Sensibilidad	95.0	8.07	86.36
Especificidad	59.1	49.8	65.5
Valor predictivo positivo	9.6	7.5	9.6
Valor predictivo negativo	99.6	99.6	99.12

útil para obtener un diagnóstico oportuno.^{4,9} En este estudio se observó que la mayoría de los cultivos realizados (41%) no presentaban microorganismos aislados, mientras que sólo 20.4% tuvo algún aislamiento; sin embargo, es importante mencionar que 38.8% de las muestras no contaban con cultivos diferentes al hemocultivo para poder conocer el foco de la probable infección fúngica diseminada (cuadro II).

Las muestras con *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* tuvieron resultados positivos para la prueba de Ag manano; sin embargo, una muestra con *C. parapsilosis* presentó un resultado falso negativo, lo que indica que para algunas especies la prueba no es tan específica, esto debido a su diferencia antigénica (cantidad de manano

presente en la pared celular).¹⁰ Diversos autores han reportado que la técnica de manano da buenos resultados con *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa* y *C. tropicalis*¹¹ pero no para *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. novyensis*, y *C. parapsilosis*.¹²

La relación entre el Ag y los cultivos micológicos (sin tomar en cuenta los hemocultivos) muestra que la técnica podría dar un resultado positivo en algunos casos de candidosis localizada aunque en un bajo porcentaje (11.3% de muestras con cultivo y Ag positivo), debido a que durante una infección además de la multiplicación del microorganismo (invasión y/o colonización), simultáneamente hay destrucción de los blastoconidios, liberando fragmentos

de pared (como el manano) que viajan por el torrente sanguíneo y pueden ser detectados por la prueba.¹³

Sólo 3.5% de las muestras presentaron hemocultivo y antígeno positivos; estos casos pueden clasificarse como candidiasis invasiva probada (*cuadro III*). Por otro lado se observa un alto número de falsos positivos (178 muestras), que pueden estar relacionados con una reacción cruzada de Ag manano y moléculas como el hidroxietilalmidón, utilizado para el tratamiento de fallos circulatorios: hipovolemia, choque hemorrágico y choque séptico.⁷ Así mismo deben de tomarse en cuenta los cultivos para *Candida*, que pueden ser positivos en sólo 24-60% de los casos. La positividad del hemocultivo depende de varios factores como la viabilidad de los blastoconidios, el inicio previo de una terapia antifúngica y el número de blastoconidios presentes en la muestra; sin embargo, el factor más importante que determina la positividad de esta prueba es el volumen de sangre procesada, pues se ha demostrado que la probabilidad de detectar al agente causal es de menos de 65%, debido a que más de la mitad de los pacientes septicémicos portan menos de un microorganismo por mL de sangre.^{4,14-16} Los resultados intermedios con hemocultivo positivo (dos muestras) pueden deberse a que el manano circulante es rápidamente clarificado, por lo que al obtener un resultado intermedio, es fundamental que se realice un muestreo frecuente para realizar su detección.^{10,17}

Para realizar la evaluación de los parámetros analíticos, los valores intermedios fueron tomados en cuenta de diferentes formas: sumados a los valores positivos de la prueba, sumados a los valores negativos y por último fueron descartados de los resultados. Sin embargo, estos resultados no deberían de excluirse del estudio debido a que representan una parte considerable de nuestra muestra total y tienen un significado clínico. El VPN de la prueba es muy alto (99%) por lo que podemos utilizar esta técnica como una herramienta que auxilia al médico a descartar el diagnóstico de candidiasis invasiva. Un resultado negativo de la prueba ayudaría a evaluar si un paciente en verdad necesita de un tratamiento antimicótico, tomando en cuenta la toxicidad del mismo y la posible aparición de cepas resistentes.

Por lo anterior, es necesario que el médico siga el algoritmo de diagnóstico de la candidiasis invasiva, tomando en cuenta los resultados de esta técnica, los factores de riesgo, los cultivos micológicos, el resultado del hemocultivo y el estado inmunitario del paciente. Todo esto, además de disminuir la mortalidad, la estancia hospitalaria

y la incidencia de esta patología podría disminuir el costo de hospitalización por candidemia.

REFERENCIAS

1. Ávila C, Cashat M, Aranda E, León A, Justiniani N, Pérez L et al. Prevalencia de infecciones nosocomiales en niños. Encuesta en 21 hospitales en México. Salud Pública Mex. 1999; 41 (1): 518-525.
2. Reséndiz J, Morales J. Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* sp. en niños. Bol Med Hosp Infant Mex. 2007; 64: 91-98.
3. Aguado J, Ruíz I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vázquez L et al. Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras, de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) Actualización 2011. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 29 (5): 345-361.
4. Argüello G. Prevalencia de Infecciones micóticas por especies de *Candida* aisladas por hemocultivo en pacientes pediátricos en una UMAE. [Tesis] México, D.F. UNAM, 2010
5. Pappas P, Kauffman C, Andes D, Benjamin D, Clandra T, Edwards J, Filler S, Fisher J, Kullberg B, Ostrosky L, Reboli A, Rex J, Walsh T, Sobel J. Clinical Practice Guidelines for the management of candidiasis: 2009. Update by the infectious Diseases Society of America. Treatment Guidelines for Candidiasis. 2009; 48: 503-534.
6. Ellapola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol. 2005; 43: 65-84.
7. Inserto Platelia® *Candida* Ag Plus. Detección de antígeno manano de *Candida* en suero o plasma humano mediante el método inmunoenzimático. Bio-Rad®. 62748: 46-66.
8. Pontón J. Microbiological non-culture methods for the diagnosis of invasive candidiasis: usefulness of surrogate markers. Rev Iberoam Micol. 2006; 23: 20-25.
9. Peman J, Zaragoza R. Hacia el diagnóstico temprano de la Candidiasis invasora en el paciente crítico. Rev Iberoam Micol. 2012; 29 (2): 71-75.
10. Pasqualotto A, Denning D. Diagnosis of invasive fungal infections – current imitations of classical and new diagnosis methods. European Onco Rev. 2005; 1: 1-9.
11. Sendid B, Poirots J, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D, Poulain D. Combined detection of mannanemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. J Med Microbiol 2002; 51: 433-442.
12. 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.
13. López R, Méndez L, Hernández F. Actualidades de Micología médica. Sefirot, UNAM, México 2012. pp. 30-32.
14. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, Microbiología Médica. Elsevier, España, 2009. pp. 189-191.
15. Ortíz F, Olivia J, Figueroa J, Soriano D. Evaluación controlada del volumen de sangre necesario para la detección de bacteremia o funguemia en recién nacidos. Rev Enf Infec en Pediat. 2005; 18 (73): 3-7.
16. Benjamin K, Garges H, Steinbach WJ. *Candida* bloodstream infection in neonates. Semin Perinatol. 2003; 27: 375-83.
17. Quindos G, Moragues M, Pontón J. The role of antigen and antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis. Mikol Lek. 2004; 11 (2): 145-151.