

# Fluorescencia directa e inmunofluorescencia indirecta en extensión leucocitaria para el diagnóstico de candidemia en pacientes pediátricos: estudio comparativo

Eric Moisés Flores Ruiz<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Guadalupe Miranda Novales<sup>1</sup>, Fortino Solórzano Santos<sup>2</sup>, Gustavo Sánchez Huerta<sup>1</sup> y Humberto Díaz Ponce<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Infectología, <sup>2</sup>Subdirección Médica y <sup>3</sup>División de Pediatría, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., México.

## Resumen

El diagnóstico de candidemia por hemocultivo tiene baja sensibilidad, lo que conlleva que pacientes inmunodeficientes y con factores de riesgo reciban tratamientos empíricos potencialmente tóxicos. Con el fin de conseguir un diagnóstico rápido y más sensible, se han desarrollado pruebas de fluorescencia para el diagnóstico de candidemia. El objetivo de este estudio fue comparar una prueba de inmunofluorescencia indirecta y otra de fluorescencia directa con blanco de calcofluor en extensión leucocitaria para el diagnóstico de candidemia. La inmunofluorescencia indirecta tuvo unos valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo del 60%, 86%, 33% y 95%, siendo los de la fluorescencia directa del 90%, 80%, 35% y 99%, respectivamente.

## Palabras clave

Candidemia, Inmunofluorescencia indirecta, Blanco de calcofluor

## Direct fluorescent and indirect immunofluorescent assay in buffy coat for candidemia diagnosis in pediatric patients: a comparative study

## Summary

The diagnosis of candidemia by blood culture has poor sensitivity; therefore, immunosuppressed patients and those with risk factors may receive empirical antifungal therapy, which is potentially toxic. Fluorescent tests have been developed to obtain an early and more sensitive diagnosis than blood culture. The aim of this study was to compare indirect immunofluorescence vs direct calcofluor white fluorescence in buffy coat for candidemia diagnosis. Sensitivity, specificity, predictive values, of positive and negative samples were 60%, 86%, 33%, 95% and 90%, 80%, 35%, 99%, for indirect immunofluorescence and calcofluor white, respectively.

## Key words

Candidemia, Immunofluorescent assay, Calcofluor white

La candidiasis invasora es la micosis oportunista más frecuente, ocupando entre el tercero y el séptimo lugar como causa de infecciones nosocomiales [4,20,23,34]. Afecta a pacientes inmunodeficientes, sobre todo con factores de riesgo. La mortalidad es del 38 al 73% y, por tanto, al existir sospecha de infección, se recomien-

da iniciar el tratamiento empírico para evitar complicaciones [13,19,22,27,28,31,35].

El método habitualmente utilizado para el diagnóstico de candidemia es el hemocultivo, cuya sensibilidad se sitúa del 10% al 43% en comparación con la necropsia [1,2,33]. Otros métodos utilizados son la detección de anticuerpos en suero con diversas técnicas (ELISA, inmunodifusión, hemaglutinación, etc.), pero los pacientes inmunodeficientes pueden tener una respuesta humoral errática [9,14,16,21,26,30,33]. La detección de componentes o antígenos fúngicos como manoproteínas, índice D-arabinitol/L-arabinitol, (1→3)-β-D-glucano, tienen sensibilidades del 13% al 87%, pero en pacientes colonizados las pruebas pueden ser positivas [5,8,10,12,17,24,29,30,33]. Los ensayos con reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Candida* permanecen limitados al ámbito de la investigación [3,6,15,18].

Se han desarrollado técnicas de fluorescencia sobre extensiones leucocitarias que permiten tener resultados en 1 a 3 h. La inmunofluorescencia indirecta en un modelo

## Dirección para correspondencia:

Dr. Eric Moisés Flores Ruiz  
Servicio de Infectología, Hospital de Pediatría  
Centro Médico Nacional Siglo XXI  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Av. Cuauhtémoc # 330, Col. Doctores  
Delegación Cuauhtémoc, México D.F. C.P. 06780  
Tel.: +55 5627 6900 Ext.22463  
Correo electrónico: dreficflores@yahoo.com

Aceptado para publicación el 22 de febrero de 2005

animal tuvo una sensibilidad del 60% comparada con la necropsia, mientras que en pacientes la sensibilidad fue del 55% [7]. Reddy y cols. [25] evaluaron la fluorescencia directa con blanco de calcofluor en extensiones leucocitarias de neonatos con candidemia, obteniendo una sensibilidad del 61%.

Para comparar la eficacia de la inmunofluorescencia indirecta y la fluorescencia directa en extensiones leucocitarias para el diagnóstico de candidemia se realizó un estudio en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Fue aprobado por los comités de Investigación y Ética y contó con financiamiento del Fondo de Fomento para la Investigación del IMSS. El grupo de estudio incluía desde recién nacidos hasta pacientes de 16 años de edad con sospecha de infección fúngica a los que se tomaron muestras hemáticas para hemocultivo y extensiones leucocitarias. Con los neonatos se utilizó una técnica de microhemocultivo [32] y en pacientes mayores se utilizó el sistema BACTEC. Para la extensión leucocitaria se centrifugó 1 ml de sangre en tubo de Wintrobe a 4000 rpm durante 7 min. Con una pipeta Pasteur se extrajo el plasma y se tomó el concentrado leucocitario; en los casos en que no se apreciaba capa leucocitaria se tomó la interfase entre el plasma y los glóbulos rojos. De cada muestra sanguínea se realizaron extensiones en portaobjetos y se fijaron por calor. Las muestras fueron procesadas por duplicado para la fluorescencia directa y para la inmunofluorescencia indirecta. Se preparó el reactivo blanco de calcofluor 0,1% (Fluorescent Brightener 28 M2R Sigma, EE.UU.) con azul de Evans 0,04% (Sigma) [11]. Las extensiones leucocitarias se lavaron por inmersión dos veces durante 2 min en PBS (tampón fosfato salino pH 7,4, Amresco, EE.UU.) y se aplicó una gota de blanco de calcofluor sobre la extensión leucocitaria que se cubrió con un cubreobjetos para su observación en un microscopio de fluorescencia (Nikon, Japón) con un filtro Epi-FL V2A (BA 450/BM 430/EX 380-425) a 40x. La inmunofluorescencia indirecta se realizó según la técnica descrita por Díaz y cols. [7]. Se utilizó un primer anticuerpo (IgG de conejo, Sigma) dirigido a *Candida* spp y un segundo anticuerpo (IgG de cabra, Sigma) marcado con fluoresceína y dirigido contra el primer anticuerpo. Para la observación al microscopio se utilizó un filtro Epi-FL B2A (BA 520/DM 510/EX 450-490). Las pruebas de fluorescencia se consideraron positivas al observar levaduras o pseudomicelios con pared celular bien definida e intensamente fluorescentes. Se realizaron con-

troles positivos y negativos en cada procedimiento. Se consideró la existencia de candidiasis invasora el aislamiento de *Candida* sp en una o más de las siguientes pruebas: hemocultivo (candidemia), cultivo de punta de catéter intravascular o la observación del microorganismo en estudios histopatológicos. Se calcularon la sensibilidad y especificidad, los valores predictivos y las razones de probabilidad e intervalos de confianza al 95% para ambas pruebas de fluorescencia. Se realizó el cálculo del índice Kappa para evaluar la concordancia considerándose adecuada una concordancia mayor que 0,61 y  $p < 0,05$ .

Se incluyeron 86 pacientes con 97 episodios de sospecha de candidemia (seis pacientes tuvieron más de un episodio). Se confirmó el diagnóstico en diez: cinco por hemocultivo, cuatro por cultivo de catéter intravascular y en un caso de necropsia con diagnóstico de neumonía por *Candida* con cultivos negativos. Las especies aisladas correspondieron en cuatro casos a *Candida albicans*, en dos a *Candida glabrata*, en dos a *Candida krusei* y en uno a *Candida tropicalis*. La fluorescencia directa fue positiva en 26 de 97 muestras (Figura 1). Todos los casos de hemocultivo y cultivo de catéter intravascular positivos para *Candida* spp. fueron positivos por fluorescencia directa. La prueba fue negativa en el caso de neumonía diagnosticada por necropsia. La sensibilidad fue del 90% y la especificidad del 80% (Tabla 1). La inmunofluorescencia indirecta fue positiva en 18 de 97 muestras (Figura 2), incluyendo tres de los cinco aislamientos de hemocultivo y tres de los cuatro aislamientos de catéter intravascular, y negativa en el caso diagnosticado por necropsia. La sensibilidad fue del 60% y la especificidad del 86% (Tabla 1). La concordancia ( $\kappa$ ) entre ambas pruebas fue de 0,65 ( $p < 0,001$ ).

El diagnóstico de la candidemia es difícil, la sensibilidad del hemocultivo es baja [1,2] y las pruebas serológicas pueden ser positivas en sujetos colonizados. En este estudio se compararon dos pruebas de fluorescencia sobre extensiones leucocitarias, encontrando una mayor capacidad de detección que la de los cultivos, con un buen nivel de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad fue mayor para la fluorescencia directa, probablemente debido a la afinidad que tiene el blanco de calcofluor por la quitina y la celulosa de la pared fúngica. Ambas pruebas son rápidas y tienen mejor desempeño que el hemocultivo en el diagnóstico de candidemia. La fluorescencia directa puede ser una alternativa rápida para el diagnóstico de la candidemia si consideramos la mayor sensibilidad y la menor probabilidad de error inherentes a la técnica.

Tabla 1. Valores diagnósticos de las pruebas evaluadas.

	Fluorescencia directa			Inmunofluorescencia indirecta		
	%	IC 95%	RV	%	IC 95%	RV
Sensibilidad	90	72-100	4,5	60	30-90	4,2
Especificidad	80	72-88	0,12	86	79-93	0,46
Valor predictivo positivo	35	17-53	NC	33	12-54	NC
Valor predictivo negativo	99	97-100	NC	95	91-99	NC
Exactitud	81	74-88	NC	83	76-90	NC
Prevalencia	10	NC	NC	10	NC	NC

IC: intervalo de confianza

RV: razón de verosimilitud

NC: no calculado

## Bibliografía

- Berenguer J, Buck M, Witebsky F, Stock F, Pizzo PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. Disseminated versus single-organ infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 17: 103-109.
- Bille J, Stockman L, Roberts GD. Detection of yeasts and filamentous fungi in blood cultures during a 10-year period (1972-1981). *J Clin Microbiol* 1982; 16: 968-970.
- Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Chanoine M. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 925-930.
- Bouza E, San Juan R, Muñoz P, Pascau J, Voss A, Desco M; Cooperative group of the European study group on nosocomial infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 838-842.
- Christensson B, Wiebe T, Pehrson C, Larsson L. Diagnosis of invasive candidiasis in neutropenic children with cancer by determination of D-arabinitol/L-arabinitol ratios in urine. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 636-640.
- Chryssanthou E, Andersson B, Petrini B, Lofdahl S, Tollemar J. Detection of *Candida albicans* DNA in serum by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis* 1994; 26: 479-485.
- Diaz-Ponce H, Solorzano-Santos F, Ruiz-Rodríguez A, Sanchez-Huerta G, Rosas-Macedo S, Aleman-Velazquez P, Torres JF, Muñoz O. Indirect immunofluorescent assay (IFA) in buffy coat as a rapid diagnostic test for invasive candidiasis. *Arch Med Res* 1995; 26: S41-S46.
- Elsayed S, Fitzgerald V, Massey V, Hussain Z. Evaluation of the candidin enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of *Candida* species antigen. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 344-346.
- García-Ruiz JC, Arilla MC, Regúlez P, Quindós G, Álvarez A, Pontón J. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3284-3287.
- Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, Cassone A. Assessment of detection of *Candida* mannoproteinemia as a method to differentiate central venous catheter-related candidemia from invasive disease. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 903-906.
- Hageage GJ, Harrington BJ. Use of calcofluor white in clinical mycology. *Lab Med* 1984; 15: 109-112.
- Hossain MA, Miyazaki T, Mitsutake K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kawamura S, Otsubo T, Hirakata Y, Tashiro T, Kohno S. Comparison between Wako-WB003 and Fungitec G tests for detection of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan in systemic mycosis. *J Clin Lab Anal* 1997; 11: 73-77.
- Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, Feld R, Pizzo PA, Rolston KV, Shenep JL, Young LS. 2002 Guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 730-751.
- Iruretagoyena JR, Regúlez P, Quindós G, Pontón J. Antibodies to *Candida albicans* germ tubes in two intensive care patients with invasive candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 93-96.
- Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis* 1993; 168: 779-783.
- Klingspor L, Stintzing G, Tollemar J. Deep *Candida* infection in children with leukaemia: clinical presentations, diagnosis and outcome. *Acta Paediatr* 1997; 86: 30-36.
- Lehtonen L, Anttila VJ, Ruutu T, Salonen J, Nikoskelainen, Eerola E, Ruutu P. Diagnosis of disseminated candidiasis by measurement of urine D-arabinitol/L-arabinitol ratio. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2175-2179.
- Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 159-163.
- MacDonald L, Baker C, Chenoweth C. Risk factors for candidemia in a children's hospital. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 642-645.
- Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggmann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Tauber MG, Pittet D; Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 311-320.
- Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR, García-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, Mendoza J, Quindós G, Pontón-San Emeterio J. Evaluación de una nueva técnica comercializada (*Candida albicans* IFA IgG) para el diagnóstico de la candidiasis invasiva. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 83-88.
- Peres-Bota D, Rodríguez-Villalobos H, Dimopoulos G, Melot C, Vincent JL. Potential risk factors for infection with *Candida* spp in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 550-555.
- Pittet D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med* 1995; 155: 1177-1184.
- Rao DS, Ghosh A, Singhi S, Chakrabarti A. Mannan antigen detection in the diagnosis of patients with intensive candidiasis. *Indian J Med Res* 2002; 116: 13-20.
- Reddy TC, Chakrabarti A, Singh M, Singhi S. Role of buffy coat examination in the diagnosis of neonatal candidemia. *Pediatr Inf Dis J* 1996; 15: 718-720.
- Rüchel R, Schaffrinski M, Shoberg P. Laboratory diagnostic peculiarities of mycoses in immunosuppressed patients. *Mycoses* 1995; 38 (Suppl. 1): S28-S32.
- Saiman L, Ludington E, Pfalter M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 319-324.
- Saral R. *Candida* and *Aspergillus* infections in immunocompromised patients: An overview. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 487-492.
- Sendid B, Jounault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M, Poulain D. Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 164-171.
- Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, Bonnin A, Cailliot 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.
- Shelenz S, Gransden WR. Candidaemia in a London teaching hospital: analysis of 128 cases over a 7-year period. *Mycoses* 2003; 46: 390-396.
- Solorzano-Santos F, Miranda-Navales MG, Leñós-Miranda B, Diaz-Ponce H, Palacios-Saucedo G. A blood micro-culture system for the diagnosis of bacteremia in pediatric patients. *Scand J Infect Dis* 1998; 30: 481-483.
- Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49 (Suppl. 1): S11-S19.
- Valenzuela-Flores AA, Rangel-Frausto MS, Gutierrez-García JN, Valenzuela-Flores AG, Tabal-Galan N. Nosocomial infection surveillance: experience at a cardiology hospital in México. *Cir Cir* 2004; 72: 41-46.
- Wenzel RP. Nosocomial candidemia: Risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1531-1534.