

Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis por *Cryptococcus spp*

Valeria, Barcia-Castilla¹; Sunny, Sánchez-Giler²

Resumen

La meningitis por *Cryptococcus spp* es un grave problema de salud pública en pacientes VIH +, por lo cual se determinó la utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para esta infección. Se obtuvieron los datos del líquido cefalorraquídeo de 252 pacientes VIH positivos admitidos de mayo a octubre del 2014 en el Hospital de Infectología de Guayaquil, Ecuador. Los análisis se realizaron por cultivo y tinta china en 81 pacientes, cuyos resultados de sensibilidad y valor predictivo negativo fueron 80% y 93,55% respectivamente. Como conclusión se consideró la tinta china como una prueba de tamizaje relativamente buena por su buen valor predictivo negativo pero medianamente buen valor sensitivo.

Palabras Clave: *Cryptococcus spp*; meningitis criptocócica; prueba de tamizaje, VIH.

Utility of indian ink as screening for meningitis by *Cryptococcus spp*

Abstract

Meningitis by *Cryptococcus spp* is a serious public health problem in HIV + patients, therefore the Indian ink utility as screening test for this infection was determined. Cerebrospinal fluid data of 252 HIV + patients admitted from May to October 2014 at the Hospital de Infectología de Guayaquil was collected. Analysis from this cerebrospinal fluid was performed by Indian ink and culture in 81 patients, whose sensibility and negative predictive value were 80% and 93,55%, respectively. As conclusion the Indian ink was considered a relatively good screening test because of its good negative predictive value but moderately good sensibility.

Keywords: cryptococcal meningitis; screening test; HIV.; screening test; *Cryptococcus spp*.

Recibido: 20 de octubre de 2015

Aceptado: 1 de junio de 2016

¹Estudiante de Medicina de la Universidad Espíritu Santo, Guayaquil, Ecuador. vmbarcia@uees.edu.ec

²Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Espíritu Santo, Guayaquil, Ecuador. sunsanchez@uees.edu.ec

I. INTRODUCCIÓN

Los *Cryptococcus spp* son basidiomicetos saprofiticos encapsulados identificados por Sanfelice en 1894 (Sloan, 2014). El *C. neoformans* serotipo A: *neoformans* causa el 30% de las meningitis en pacientes VIH positivo en Europa del norte (Sloan, 2014) y es el responsable del 85% de meningitis en Latinoamérica, de las cuales el 80% son pacientes VIH positivo (Sifuentes-Osornio, 2012).

C. neoformans neoformans causa enfermedades en pacientes inmunosuprimidos, mientras que *C. neoformans gattii* afecta preferentemente a los inmunocompetentes (Lizarazo, 2014). Encontrándose la meningitis por *Cryptococcus neoformans neoformans* no sólo en pacientes VIH+, sino también en pacientes inmunosuprimidos (Revest, 2006).

Se documentó que el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) afectó a 3438 ecuatorianos en el 2011, encontrándose el 58,24% de ellos en la provincia del Guayas (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2011) cuya capital es Guayaquil, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Casos notificados de VIH por sexo y edad Ecuador 2011

Grupo etáreo	Hombre	Mujer	Total
< 1	2	0	2
1-4	72	70	142
5-9	13	15	28
10-14	9	7	16
15-19	81	70	151
20-24	253	161	414
25-29	285	164	449
30-34	251	132	384
35-39	173	87	260
40-44	121	62	183
45-49	84	34	118
50-54	66	20	86
55-59	40	16	56
60-64	24	8	32
65+	39	65	45
Sin datos			1.072
Total	1.514	852	3.438

Fuente: MSP, 2015

Según Schwab (1999) más de la mitad de los pacientes con VIH presentan síntomas neurológicos a lo largo de su enfermedad. Además, se ha encontrado que en el 60% de los pacientes este episodio clínico meníngeo es con el que debuta su infección por el VIH (Sifuentes-Osornio, 2012). En Estados Unidos la incidencia está alrededor del 10% y en el mundo el 90% de los síntomas neurológicos en estos pacientes se deben a este hongo (Brockmeyer, 1997).

La meningitis por *Cryptococcus spp.* es una infección oportunista que afecta a casi un millón de individuos, causando más de 500.000 muertes cada año y es la cuarta causa más común de infecciones graves en pacientes VIH positivo (Dominic, 2009). La presentación clínica en pacientes VIH positivo más común es la meningoencefalitis. La duración de las manifestaciones clínicas, tales como jaqueca subaguda y confusión pueden variar desde unos pocos meses hasta veinte años. De acuerdo con estudios realizados por Chiang y otros (2011), la cuarta enfermedad más prevalente en el Hospital de Infectología de Guayaquil es la criptococosis diseminada, precedida por la toxoplasmosis cerebral.

Esta infección es fatal si no es diagnosticada y tratada a tiempo y aunque fuese revertida exitosamente podría dejar graves secuelas neurológicas, entre las que se destacan ceguera e hidrocefalia (Sloan, 2014). Siendo oftálmicas muchas de las complicaciones de estos pacientes. Pudiéndose presentar además de la ceguera; diplopía binocular, parálisis del nervio abducens ya sea monocular o binocular, papiledema, hemorragias peripapilares, atrofia óptica, coroiditis multifocal, retinitis por citomegalovirus entre otros (Mao, 2015). Es por esto que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda hacer pruebas de tamizaje de infecciones criptocócicas a pacientes VIH positivo con recuento de $CD4 \leq 100/\mu L$.

Para que una prueba de tamizaje sea eficiente se necesita que tenga una alta sensibilidad, que sea barata y que tenga un alto valor predictivo negativo. La prueba por tinta china (TCH) como tamizaje es barata y solo se necesita que el personal de laboratorio sepa reconocer levaduras encapsuladas en el microscopio. En este trabajo de investigación se busca determinar estos parámetros para poder establecer su calidad como prueba de tamizaje en Guayaquil.

A pesar de que el cultivo (CM) es el estándar de oro para el diagnóstico, su realización es costosa y

requiere de equipamiento e infraestructura, además de la cantidad de tiempo de espera para el resultado del cultivo (alrededor de las 48 horas), que en comparación con métodos de tinta china (TCH), aglutinación por látex (AL) y flujo lateral (FL), es demasiado largo.

El objetivo general de esta investigación es determinar si la prueba de tinta china es una eficiente prueba de tamizaje para meningitis por *Cryptococcus spp*, mientras que otros objetivos secundarios son identificar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba de tinta china. Además, se busca definir la correlación entre los resultados de la TCH y el cultivo y comparar valores con otros métodos de tamizaje.

Con esta investigación se espera un aporte social a fin de crear una cultura de realización de pruebas de tamizaje por cualquier método recomendado en pacientes VIH con recuento de CD4 $\leq 100/\mu\text{L}$. Se tiene como meta que con la información obtenida sobre la utilidad de la TCH como prueba de tamizaje, las autoridades sanitarias tomen decisiones a nivel hospitalario a fin de utilizar la prueba de TCH en comparación con otros métodos para lograr hacer un diagnóstico y tratamiento temprano y así conseguir evitar consecuentes secuelas.

II. DESARROLLO

1. Metodología

Este estudio es de tipo no experimental, ya que no se manipuló ninguna variable, descriptiva, transversal, cualitativa, observacional, analítica y retrospectiva, por lo

que no necesita un diseño muestral. Los instrumentos de investigación fueron las fichas de laboratorio obtenidas en el Hospital de Infectología, a partir de las cuales se creó una base de datos en Excel, donde los datos fueron posteriormente tabulados y debidamente divididos.

El universo del estudio consta de 252 líquidos cefalorraquídeos (LCR) tomados de pacientes admitidos al Hospital de Infectología de Guayaquil, Ecuador, de mayo a octubre de 2014. Los criterios de inclusión fueron; pacientes diagnosticados con síndrome meníngeo por sus doctores, mayores de 18 años, que no estén tomando antimicóticos y que sean VIH + por dos pruebas de ELISA positiva o una de Western Blot.

La muestra de LCR se fijó en una placa con dos gotas de tinta china. 5 minutos después se observó a 10x y 40x en el microscopio. Para que una prueba de TCH sea positiva, debía diferenciarse en el microscopio una forma levaduriforme con cápsula. Si no se encontraba, era tomado como negativo. Los cultivos en los que se estudiaban las muestras de LCR eran agar MacConkey, agar Löwenstein-Jensen, agar sangre y agar Sabouraud, siendo este incubado a 37°C y 25-27°C y para que estos sean positivos, se esperaron de 72 a 96 horas máximo.

Las variables estimadas una vez analizados los datos recolectados fueron prevalencia de meningitis por TCH y por cultivo, especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. En la Tabla 2 se muestran las fórmulas utilizadas para determinar las variables.

Tabla 2. Fórmulas para determinar variables

TCH	E	S	VPP	VPN
F	$= \frac{VN \times 100}{TS}$	$= \frac{VP \times 100}{TE}$	$= \frac{VP \times 100}{TP}$	$= \frac{VN \times 100}{TN}$

Leyenda: F: fórmula; R: resultado; E: especificidad; S: sensibilidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; P: prevalencia, VN: verdaderos negativos; TS: total sanos; VP: verdaderos positivos; TE: total enfermos; TP: total positivos; TN: total negativos

2. Resultados

De este universo de 252 LCR, 130 fueron estudiados por ambos métodos. El 91,54% (119) de los pacientes estudiados solo por cultivo fue negativo, el 8,46% (11) positivo. El 92,68% (38) de los pacientes estudiados solo por TCH fueron negativos y el 7,32% (3) positivos. De los 81 LCR estudiados por ambos métodos, el 71,6% (58) de los pacientes fueron hombres, mientras que el 28,4% (23) fueron mujeres, como se muestra en la Tabla 3. Además, el 71,6% (58) fue negativo para ambos y el

19,75% positivo (16). Solo 3 fueron positivos por TCH y negativos por cultivo y 4 negativos por TCH y positivos por cultivo, tal y como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3. División de muestra por género de pacientes

	Número	Porcentaje (%)
Hombres	58	71,6%
Mujeres	23	28,4%

Tabla 4. División de métodos de diagnóstico del universo de pacientes con síndrome meníngeo

Un método: 171			
Solo TCH: 41		Solo CM: 130	
+ 3	- 38	+ 11	- 119
Dos métodos: 81			
TCH y CM		TCH + CM -	TCH - CM +
+ 16	- 58	3	4

Los números obtenidos al tabular la información se muestran agrupados en una tabla de 2x2 (Tabla 5) bajo criterios que se aplican a las fórmulas de especificidad, sensibilidad, valor predictivo negativo (VPN) y valor predictivo positivo (VPP), arrojados en la Tabla 6.

Tabla 5. Resultados de prueba diagnóstica de TCH a grupos conocidos + (enfermos) y - (sanos) por CM

CRY			
TCH	+ presencia enfermedad	- ausencia enfermedad	Total
+	VP	FP	TP
	16	3	19
-	FN	VN	TN
	4	58	62
Total	TE	TS	81
	20	61	(muestra)

Leyenda: CRY *Cryptococcus* VP verdaderos positivos, FP falsos positivos, FN falsos negativos, VN verdaderos negativos, TE total enfermos, TS total sanos, TP total positivos, TN total negativos.

Tabla 6. Resultados según técnicas de TCH y CM

TCH	E	S	VPP	VPN
R	95,02%	80%	84,21%	93,55%

Leyenda: F: fórmula; R: resultado; E: especificidad; S: sensibilidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Conociendo ya que la TCH es una prueba de bajo costo, se opta por determinar la sensibilidad y el valor predictivo negativo, para entonces establecerla como una eficaz prueba de tamizaje si tuviese estas tres características. Además, se calcularon los valores de sensibilidad y valor predictivo positivo (VPP) aplicando las fórmulas mostradas en la Tabla 2. La sensibilidad fue 80% y el VPN fue 98,438%.

Análisis y Discusión de Resultados

En estudios previos se ha hablado de la sensibilidad de la TCH (Wang, 2015), que ha sido parecida a la obtenida

en esta investigación (73,2% vs 80%), a pesar de que las técnicas y los encargados de la técnica varían dependiendo del país y hospital. Comparando otros valores de la prueba de la TCH con la inmunocromatografía: flujo lateral, con la aglutinación por látex y con el cultivo, se encuentra que la prevalencia por aglutinación en látex en pacientes con CD4 menor a 100 es baja; entre 3,5% y 5% (Chipungu, 2015). Mientras que la prevalencia de las 81 muestras en este estudio con TCH fue de 23,45% y con cultivo fue de 24,7% pero a pesar de que el cultivo es el estándar de oro, este tiene 69,9% de sensibilidad, en comparación con el test de aglutinación en látex: 91,1% y TCH 73,2%. Aun así, la especificidad de la aglutinación en látex es del 96%, en comparación con 100% de TCH y cultivo (Wang, 2015).

Por un lado se podría asegurar que la TCH es una prueba eficaz como tamizaje para pacientes VIH +, pues su sensibilidad es alta pero tanto el cultivo como la TCH son bastante específicos, a pesar de que toman más tiempo y dedicación en realizarse. Por otro lado, la aglutinación en látex es más rápida, fácil, específica y más importante sensible en comparación con estos otros dos métodos convencionales (Dominic, 2009) pero se recomienda más bien el uso de la prueba de inmunocromatografía de flujo lateral CrAg como tamizaje en pacientes VIH + con recuento de CD4 $\leq 100/\mu\text{L}$, pues el costo-beneficio es justo. En este estudio, también se recomienda el uso de la inmunocromatografía, pero no sin antes recomendar también rigurosos estudios comparativos de flujo lateral, TCH, cultivo y aglutinación en látex en Ecuador, ya que existen falsos negativos en el cultivo - lo cual podría ser a causa del tratamiento que sobrelleva el paciente en el momento de la toma de la muestra (Dominic, 2009) - y también por los falsos positivos presentados en la aglutinación por látex cuando hay infecciones por *Trichosporon beigelii* y bacilos DF-2 (bacilo fermentador disgónico 2, un bacilo gramnegativo) (Dominic, 2009).

III. CONCLUSIONES

Los valores expuestos por la prueba de TCH en este estudio y comparando con otros sobre la misma técnica han sido altos al referirse a la sensibilidad pero medianamente altos en cuanto al valor predictivo negativo. Es por esto que se puede considerar una prueba de tamizaje buena, más no excelente, pues

la sensibilidad del 80% podría dejar escapar algunas muestras positivas.

Como futura investigación en Ecuador se deberían realizar estudios con otras pruebas de tamizaje como flujo lateral o aglutinación en látex, pues así se determinaría finalmente cuál es la mejor prueba a utilizar en este país y se marcaría un cambio drástico en el modus operandi de los hospitales y así también en el pronóstico de los pacientes, que depende del rápido y eficaz diagnóstico de esta infección.

IV. REFERENCIAS

- Arias, B. G. (2011). Cryptococcosis meníngeo: características clínicas y de laboratorio. *Acta Neurología Colombia*, 27(1), 19-27.
- Brockmeyer, N. (1997). HIV-Infektion. Berlin: Springer
- Chiang, H., & Tettamanti, D. (2011). Tinta china en orina como método de diagnóstico en criptococosis diseminada asociado a VIH/SIDA. Estudio transversal realizado en el hospital de infectología "José Rodríguez M." durante el año 2009. *Revista de Medicina de la UCSG*, 16(2), 116-23.
- Chipungu, C. (2015, Julio 2). Feasibility and Acceptability of Cryptococcal Antigen Screening and Prevalence of Cryptocococemia in Patients Attending a Resource-Limited HIV/AIDS Clinic in Malawi. *Journal of International Association AIDS care*.
- Dominic, R. S. (2009). Diagnostic Value of Latex Agglutination in Cryptococcal Meningitis. *J Lab Physicians*, 1(2), 67-68.
- Lizarazo, J., & Escandón, P. (2014). Retrospective Study of the Epidemiology and Clinical Manifestations of *Cryptococcus gattii* Infections in Colombia from 1997–2011. *Neglected Tropical Diseases*, N/A (N/A).
- Mao, F. (2015). Ophthalmic manifestations in acquired immune deficiency syndrome patients with cryptococcal meningitis. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 51(5), 364-8.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2011). *VIH/Sida e Infecciones de Transmisión Sexual en Ecuador*. Quito: Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
- Ministerio de Salud Pública. (2015, Agosto 14). Ministerio de Salud Pública. Retrieved from <http://www.salud.gob.ec>
- MW, T. (2015, Enero). The cryptococcal antigen lateral flow essay: A point-of-care diagnostic at an opportune time. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-9.
- Revest, M. (2006). Infections à cryptocoque chez des patients non VIH. À propos de quatre cas et revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne*, 27(3), 203-8.
- Schwab, S., & D., K. (1999). *Neurologische Intensivmedizin*. Berlin: Springer-Verlag.
- Sifuentes-Osornio, J. (2012). Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*, 6, 23-34.
- Sloan, D. (2014). Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clinical Epidemiology*, 6, 169-82.
- Trombetta, L., & Amadeo, J. B. (2010). Diagnóstico de criptococosis a partir de lesiones cutáneas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 44 (1), 33-6.
- Wang, H. (2015). Latex agglutination: diagnose the early cryptococcus neoformans test of capsular polysaccharide antigen. *Pak J Pharm*, 1 (1), 307-11.

Agradecimientos

Al Dr. Washington Alemán por su asesoría académica, a María Paula Wills, Gianna Espinoza, Steven Montesdeoca, Héctor Sotomayor, y Roberto Santos por su colaboración en la recolección de datos que hicieron posible este trabajo. Además, al personal de laboratorio del Hospital de Infectología de Guayaquil por su predisposición para la obtención de datos