



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Medicina  
División de Estudios de Posgrado  
Hospital de Pediatría C.M.N. Siglo XXI I.M.S.S.

**UTILIDAD DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA  
EN CONCENTRADO LEUCOCITARIO EN LA DETECCION  
DE CANDIDEMIA EN PACIENTES PEDIATRICOS  
(Estudio de Fase 1)**

**T E S I S**

Que para obtener el Diploma de

**MAESTRO EN MEDICINA PEDIATRIA**

**p r e s e n t a**

**DR. GUSTAVO } SANCHEZ HUERTA**



**TUTORES:**

**DR. FORTINO SOLORIZANO SANTOS  
DR. HUMBERTO DIAZ PONCE**

**MEXICO, D. F.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A mis padres Guillermo y Ma. Teresa y a mi esposa Ivette por su apoyo.

A mis hermanos Guillermo, Alejandro, Ma. Teresa, Alma Rosa y José Arturo por su ejemplo.

A Ana Martha, Verónica, Jaime, Roberto, José Roberto, Gloria y David.

A los Dres. Fortino Solórzano Santos y Humberto Diaz Ponce por sus enseñanzas que han trascendido más allá del hospital.

## CONTENIDO

Resumen.....	1
Antecedentes .....	2
Sujetos, Material y Métodos .....	7
Procedimientos .....	8
Análisis de los Datos .....	10
Resultados .....	11
Discusión .....	13
Perspectivas Clínicas .....	16
Figura No. 1 .....	19
Figura No. 2 .....	20
Corolario Metodológico .....	21
Conclusiones .....	24
Bibliografía .....	25

## RESUMEN

**OBJETIVO:** Estandarizar la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA) en frotis de concentrado leucocitario (Buffy-Coat) de sangre periférica y compararla con hemocultivo en la detección de candidemia en pacientes pediátricos con factores de riesgo para Candidosis invasiva.

**MATERIAL Y METODOS:** Se incluyeron 40 pacientes; de quienes a la par, se obtuvo sangre para hemocultivo y concentrado leucocitario. Los hemocultivos se procesaron siguiendo el procedimiento estandar. El concentrado leucocitario se obtuvo por centrifugación a 4 000 rpm, con el cual se realizaron frotis que fueron procesados con la técnica de IFA.

**RESULTADOS:** En 22 pacientes (55%), se detectó Candida por IFA en concentrado leucocitario. A 4 pacientes (10%) se les aisló Candida en hemocultivo. IFA en concentrado leucocitario detectó al 100% de los pacientes con hemocultivo positivo. Hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar las proporciones de resultados positivos de IFA en concentrado leucocitario contra hemocultivo con una "P" de 0.0001.

**CONCLUSIONES:** IFA en concentrado leucocitario detecta Candidemia con mayor frecuencia que con hemocultivo. Sus ventajas son que se puede realizar en pocas horas y que el resultado positivo puede apoyar el inicio de tratamiento con Anfotericina B en pacientes pediátricos con factores de riesgo para Candidosis invasiva.

## ANTECEDENTES

Los avances de la medicina moderna han traído como consecuencia una mejora en la expectativa de vida de pacientes con enfermedades crónicas (cáncer, enfermedades de la colágena, SIDA, etc.) que por lo común tenían mal pronóstico. Con el incremento en el número de estos pacientes, proporcionalmente ha aumentado la incidencia de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos oportunistas. Las bacterias causan la mayoría de estas infecciones; sin embargo, cada vez es mayor la frecuencia de las causadas por hongos (1). Los principales factores de riesgo asociados a infecciones micóticas que se han reconocido son: edades extremas de la vida, diabetes, SIDA, drogadicción, cirugía extensa, uso de catéteres, prótesis, esteroides y neutropenia (2-4).

Las micosis que comúnmente ocurren en los pacientes inmunocomprometidos son causadas por *Candida* spp, *Aspergillus* spp y Mucorales. Proporcionalmente, la mayoría son ocasionados por *Candida* spp (5). Los casos de Candidosis invasiva se reportan con una tendencia ascendente; empero, la información deriva de diversas series de autopsias (6). El diagnóstico de Candidosis invasiva sólo en un 15 a 40% de los casos se realiza por hemocultivos, esto debido a que la candidemia es un fenómeno transitorio e intermitente (1,8). La mayoría de los casos son diagnosticados postmortem; lo cual refleja la gravedad de la infección y la dificultad para detectarla en el momento oportuno en que puede iniciarse tratamiento.

Aunque la recuperación de hongos a partir de hemocultivos no siempre es un índice confiable de enfermedad invasiva o diseminada, continúa siendo el método estandar para la detección de fungemia. Se han diseñado distintos métodos para incrementar la posibilidad de detección de hongos a partir de muestras sanguíneas; entre los mejores se encuentran el propuesto por el grupo de Bille (9), quienes emplean un medio bifásico de BHI (Biphasic brain hearth infusion blood culture) con mejores resultados incluso que los métodos radiométricos y solamente superado por el sistema de Lisis Centrifugación (Isolator); este último método se ha considerado que aumenta las probabilidades de aislamiento (sensibilidad del 79%) y con mayor rapidez. El sistema consiste en lisado de las células sanguíneas, concentrado del lisado por centrifugación y siembra directa en medios de cultivo en caja (Soya Trypticase, Agar Chocolate, Sabouraud) (8,9).

Aún y cuando se han mejorado los métodos de hemocultivo, se ha observado que en un 56% de casos de Candidosis invasiva diagnosticados por autopsia, no fueron diagnosticados por hemocultivos.

Dada la dificultad para establecer el diagnóstico de Candidosis invasiva se han desarrollado tres grupos de técnicas: 1) detección de anticuerpos anticandida, 2) detección de antígenos de Candida y 3) detección de metabolitos.

Para la detección de anticuerpos, se ha empleado inmunoprecipitación, contraelectroforesis, aglutinación en látex, hemaglutinación pasiva, inmunofluorescencia indirecta, ELISA, radioinmunoanálisis y Western Blot; sin embargo, la sensibilidad es variable debido a que la gran mayoría de pacientes que padecen Candidosis invasiva, son inmunocomprometidos, por lo tanto, la producción de anticuerpos anticandida está alterada. La especificidad (del 27 al 70%) se afecta porque la sola colonización con *Candida* estimula también la producción de anticuerpos, de tal manera que se incrementa la proporción de falsas positivas (10).

Las técnicas diseñadas para detección de antígenos incluyen ELISA para detección de Manana (con el inconveniente de que este antígeno circula en muy bajas concentraciones, forma complejos inmunes y es eliminado rápidamente de la circulación) (11) y detección de Enolasa por ELISA (cuya sensibilidad varía del 64 al 85%, con especificidad del 96%) (12). Recientemente se reportó un estudio para la detección del antígeno 1-3-Beta-D-Glucano; la sensibilidad y especificidad encontrados fueron de 90 y 100%, respectivamente (13).

Con respecto a la detección de metabolitos tales como Arabinitol y Manosa, las limitaciones radican en su baja especificidad y en que para su detección se necesita emplear cromatografía de gas líquido, la cual limita el número de muestras a investigar por día y requiere de mayor tiempo para obtener el resultado. Además, dichos metabolitos se encuentran elevados en pacientes diabéticos o con insuficiencia renal. (14-16).

Un enfoque diagnóstico poco explorado es el empleo de detección de *Candida* en Concentrado Leucocitario (Buffy Coat). Los escasos estudios realizados han sido de reportes de casos. Esta prueba consiste en concentrar y separar por centrifugación los leucocitos de muestras sanguíneas, y a partir del concentrado leucocitario realizar un extendido en un portaobjetos que se fija por calor y puede ser teñido por diversas técnicas (17, 18). En 1985, Ascuitto y colaboradores, emplearon la técnica por primera vez para el diagnóstico de infección micótica sistémica en muestras tomadas a través de catéteres. Los datos más relevantes de su estudio fueron que en los cultivos sembrados a partir del concentrado leucocitario hubo crecimiento más rápido y con mayor frecuencia en comparación a los hemocultivos tradicionales, y que la tinción de los frotos con la técnica de Gram les permitió la detección temprana de levaduras en las muestras de los pacientes cuyos cultivos fueron positivos (19).

Dos años más tarde, Cattermole y Rivers, utilizaron esta técnica en un paciente pretérmino encontrando con notable facilidad la presencia de *Candida*. La conclusión de este reporte fue que mediante esta técnica se logró "concentrar" al agente, lo cual facilitó su detección (20). Hasta el momento no hay estudios clínicos publicados que evalúen la técnica de búsqueda de *Candida* en frotos hechos a partir de concentrado leucocitario, en combinación con Inmunofluorescencia.

Para evaluar esta combinación de técnicas, en nuestro grupo de investigación se desarrolló un modelo animal de Candidosis sistémica en Conejos Nueva Zelanda.

Los resultados del estudio (fig. 1) mostraron de forma categórica que la observación mediante IFA del concentrado leucocitario de una muestra de sangre es una fuente que incrementa la posibilidad de la detección de Candida y que esta técnica es superior a los hemocultivos en caldo de polipeptona (Vacutainer). La detección del agente se realizó en menor tiempo (21).

En este trabajo se inicia la primera fase de validación de esta prueba diagnóstica comparándola con hemocultivos en pacientes pediátricos con factores de riesgo para Candidosis invasiva. Esta fase consiste en la estandarización de los procedimientos de que consiste la prueba y nos permite conocer el momento óptimo de la toma del estudio, características y condiciones de las muestras. Los pacientes son aquellos que representan casos típicos o formas graves de la enfermedad y no se utilizan sujetos control; nos da una idea general de la sensibilidad de la prueba (25).

## **SUJETOS, MATERIAL Y METODOS**

Se realizó un estudio transversal en el Hospital de Pediatría del CMN, "Siglo XXI" del IMSS, de marzo de 1993 a enero de 1995.

Se seleccionaron pacientes con edades comprendidas desde recién nacidos hasta 16 años y que reunieron 3 o más de los siguientes criterios:

- 1) Sospecha de infección sistémica caracterizada por: fiebre o distermia, ataque al estado general, hepatoesplenomegalia, ictericia, apnea, distensión abdominal, taquicardia, polipnea, trastornos vasomotores, etc.
- 2) Tratamiento con antibióticos de amplio espectro por 4 o más días.
- 3) Presencia de catéter intravascular por 3 o más días.
- 4) Apoyo nutricional con alimentación parenteral.
- 5) Neutropenia menor a 500 neutrófilos absolutos.
- 6) Tratamiento inmunosupresor: corticoesteroides y/o quimioterapia.
- 7) Desnutrición grave.
- 8) Enfermedad hemato-oncológica.

Fueron excluidos del estudio los pacientes a quienes las muestras sanguíneas no fueron tomadas simultáneamente para las pruebas de diagnóstico a evaluar.

**PROCEDIMIENTOS:**

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les tomaron muestras de 3 ml de sangre que se utilizaron para la obtención del concentrado leucocitario para inmunofluorescencia indirecta (1 ml) y hemocultivos (2 ml).

Una parte de la muestra (1ml) se colectó en tubos estériles conteniendo 3 mg de EDTA. Posteriormente se colocó en tubos Wintrobe y se centrifugó a 4000 rpm durante 7 minutos (Centrifuga Hermle Z-320). El concentrado leucocitario (Buffy Coat) se tomó con una pipeta Pasteur estéril y se utilizó para realizar los frotos. En los casos en que no se obtuvo concentrado leucocitario visible, la muestra para el frote fue la que se obtuvo de la interfase entre el concentrado eritrocitario y el suero. Todas las muestras se fijaron por calor y los frotos fueron procesados con la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA) que brevemente se describe:

A la laminilla fijada con calor se colocó un anticuerpo anticandida, obtenido de conejo (diluido 1:50 en PBS al 0.01 M con pH de 7.2); se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 45 minutos, se lavó por inmersión en PBS durante 10 minutos (dos lavados) y posteriormente se enjuagó con agua estéril.

Se colocó un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (marcado con fluoresceína y diluido 1:50 en PBS), se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 45 minutos, se lavó por inmersión en PBS durante 10 minutos (dos lavados) y posteriormente se lavó con agua estéril.

Por último, se colocó una solución de Glicerina en PBS y un cubreobjetos. Se hizo la observación al microscopio de fluorescencia (Zeiss).

Los anticuerpos utilizados en la técnica de IFA fueron policlonales; el primero es de un suero hiperinmune de conejos inmunizados con levaduras muertas de Candida albicans. El segundo anticuerpo es de suero hiperinmune de cabra anti-IgG de conejo marcado con fluoresceína.

Las muestras para hemocultivo se inocularon en tubos con caldo de polipeptona (Vacutainer), los cuales fueron incubados a 37°C, realizándose restembras a las 24 y 48 horas en medios de Agar Sangre, Agar Chocolate y Agar McConkey. Estos medios fueron incubados a 37°C durante 24 horas realizándose la identificación del microorganismo en los casos en que hubo crecimiento. El caldo de polipeptona se mantuvo incubado durante 4 semanas haciéndose restembras semanales.

Las preparaciones fueron observadas por dos expertos y fueron catalogadas de acuerdo a los siguientes criterios:

**PARA IFA:**

- 1) POSITIVA:** Cuando se observaron levaduras o pseudomicelios intensamente fluorescentes.

**2) INESPECIFICA** (o artefacto): Cuando la fluorescencia no mostraba estructuras levaduriformes.

**3) NEGATIVA:** Cuando no se observaron levaduras.

**PARA LOS CULTIVOS:**

**1) POSITIVOS:** Desarrollo de colonias que fueron identificadas como levaduras del género *Candida*.

**2) NEGATIVOS:** Cuando no hubo desarrollo de colonias de *Candida* durante un periodo de observación de 4 semanas; o en su defecto, que hubiese crecimiento de bacterias.

**ANALISIS DE LOS DATOS:**

Se calculó sensibilidad para IFA tomando como Estandar de Oro al resultado del Hemocultivo. Por otra parte, se comparó la proporción de resultados positivos para IFA y hemocultivo en los pacientes estudiados mediante la prueba de Fisher.

No se calcularon especificidad y valores predictivos para las pruebas dado que no se utilizaron controles en el estudio.

La concordancia inter-observador fue determinada mediante el cálculo de Kappa.

## RESULTADOS

Durante los 23 meses del estudio, se incluyeron 50 pacientes con factores de riesgo para Candidosis invasiva, de los cuales 10 (20%) se excluyeron por no haberse tomado los estudios simultáneamente.

Del total de 40 casos estudiados, por grupo de edad hubo 10 (25%) adolescentes, 9 preescolares (22.5%), 8 escolares (20%), 12 lactantes (30%) y un neonato (2.5%). Predominó el sexo masculino con una relación de 3:1. Veinticinco casos fueron pacientes neutropénicos con fiebre más otro criterio de inclusión; 15 pacientes eran no neutropénicos pero con 3 o más factores de riesgo para Candidosis invasiva.

En los 40 casos estudiados, se obtuvieron en forma simultánea un hemocultivo y muestra para concentrado leucocitario e IFA. Cuatro de los 40 pacientes (10%), tuvieron hemocultivo positivo para *Candida*, dos eran pacientes neutropénicos y 2 no neutropénicos. En los 4 casos se detectó candidemia en concentrado leucocitario por IFA.

En la tabla 1 se muestra el porcentaje de resultados positivos para IFA y hemocultivo en los 40 pacientes estudiados que fueron definidos con alta predisposición para Candidosis invasiva por la presencia de factores de riesgo.

**TABLA 1.**  
**PORCENTAJE DE POSITIVIDAD DE IFA Y HEMOCULTIVO EN 40 CASOS**  
**PROBABLES DE CANDIDOSIS INVASIVA DEFINIDOS POR LA PRESENCIA**  
**DE FACTORES DE RIESGO.**

<b>Prueba</b>	<b># de Pos.</b>	<b># de Neg.</b>	<b>Total</b>	<b>%</b>
IFA en CL*	22	18	40	55
Hemocultivo	4	36	40	10

**IFA en CL = Inmunofluorescencia Indirecta en Concentrado Leucocitario.**  
**Pos. = Positivos.                      Neg. = Negativos.**

De esta forma, el porcentaje de resultados positivos para hemocultivo fue del 10% y para IFA en concentrado leucocitario del 55% con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ).

La concordancia inter-observador medida a través de Kappa fue de 0.75.

## DISCUSION

La baja sensibilidad del hemocultivo como una prueba útil en el diagnóstico de Candidosis invasiva es una problema que ha motivado la investigación de opciones más efectivas para detectar esta complicación. Los problemas a que se han enfrentado los diversos grupos de investigadores al respecto, son la dificultad para recuperar *Candida* en los diversos medios de cultivo, la imposibilidad de "concentrarla" para detectar sus antígenos y metabolitos y la irregularidad de la respuesta inmunológica como indicador de infección sistémica, especialmente en pacientes neutropénicos (10, 15, 16).

De acuerdo a lo sugerido en los trabajos de Ascutto y Cattermole (19, 20), mediante el estudio del concentrado leucocitario de una muestra de sangre, es posible identificar fácilmente levaduras a través de tinciones y es posible recuperar *Candida* en cultivos en mayor número de veces y más rápido que con los métodos convencionales. A la fecha, estas conclusiones se basan en el estudio de sólo unos cuantos pacientes.

Este estudio se fundamentó en el empleo de dos técnicas: la primera, que consta de la obtención del concentrado leucocitario en una muestra de sangre y la segunda, una técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra la pared del microorganismo que facilita la observación de levaduras evidenciadas mediante el segundo anticuerpo marcado con fluoresceína.

Esta combinación de técnicas no había sido previamente utilizada en la detección de Candidemia. La inmunofluorescencia directa fue utilizada previamente para la detección de Candida en biopsias (22).

En este trabajo se inició el estudio de la prueba en el campo clínico en pacientes con factores de riesgo para desarrollar enfermedad invasiva por Candida. A pesar de sus limitaciones, se utilizó al hemocultivo como estandar de oro, considerando que hasta ahora es una de las pruebas más usadas y accesibles para el diagnóstico de Candidosis invasiva (12). La división subsecuente de los pacientes tomando en cuenta la presencia o no de neutropenia se debió a un interés particular, ya que aquellos con neutropenia severa son un grupo frecuentemente encontrado en nuestro hospital; sin embargo, en todos los casos hubo factores de riesgo suficientes para desarrollar Candidosis invasiva.

Sólo en 4 (10%) de los 40 hemocultivos se recuperó Candida, lo cual es similar al porcentaje de hemocultivos positivos para este agente observado en nuestro hospital durante 1994 que fue aproximadamente del 7% (Laboratorio de Microbiología, Hospital de Pediatría C.M.N. "Siglo XXI"; dato no publicado). Este hallazgo refuerza el concepto respecto a la baja sensibilidad del hemocultivo como prueba única para el diagnóstico de Candidosis invasiva.

A pesar del bajo porcentaje de recuperación de Candida, en el 100% de los pacientes con hemocultivo positivo, la inmunofluorescencia fue igualmente positiva. Por otro lado, en 18 (55%) casos la inmunofluorescencia fue positiva con sus correspondientes hemocultivos negativos, consideramos que estos resultados pudieron corresponder a "verdaderos positivos", ya que fueron seleccionados casos con factores de riesgo, en los que se conoce por estudios de autopsias el porcentaje de infección sistémica por Candida oscila entre el 40 y 70% (6). A favor de este punto está la alta concordancia inter-observador encontrada dado que es una prueba objetiva, observándose directamente las levaduras, siendo poco probable confundirlas al microscopio (Fig. 2). Por último, si consideramos a los 40 casos con alta predisposición para Candidosis invasiva en base a la presencia de factores de riesgo, IFA demostró ser superior al hemocultivo (55 Vs. 10% de resultados positivos respectivamente  $P < 0.0001$ ).

Finalmente, el porcentaje de pruebas positivas mediante IFA en concentrado leucocitario (55%) es quizá un reflejo más cercano de la prevalencia real de Candidosis invasiva en la población estudiada.

## **PERSPECTIVAS CLINICAS**

La dificultad para establecer el diagnóstico de Candidosis invasiva impone la necesidad de detectarla oportunamente, para lo cual IFA se propone como una alternativa rápida y fácil de realizar. En ningún caso el hemocultivo fue positivo con IFA negativa, lo que sugiere que en los sujetos que estudiamos la sensibilidad, lo cual aún deberá de terminarse.

La alta letalidad (70%) reportada en pacientes con factores de riesgo para Candidosis invasiva ha motivado el inicio empírico de tratamiento antifúngico en forma cada vez más temprana. La detección de Candida por IFA en concentrado leucocitario en una muestra de sangre en estos pacientes probablemente apoyaría la decisión de iniciar tratamiento con Anfotericina B, disminuyendo el inicio empírico de este medicamento en pacientes hemato-oncológicos con neutropenia y fiebre (23). En todos los casos el riesgo de tratar a estos pacientes es menor al de mantener una conducta expectante aún y cuando conocemos los problemas asociados al manejo con Anfotericina. A este respecto, hay cada vez un mayor número de medidas que permiten reducir y controlar su toxicidad (24).

Por el momento, ya que desconocemos la especificidad de IFA en concentrado leucocitario, no se puede sugerir dejar sin tratamiento a aquellos pacientes con IFA negativa y con factores de riesgo para enfermedad invasiva por Candida.

La detección de Candida a través del estudio del concentrado leucocitario de una muestra de sangre mediante IFA tiene las siguientes ventajas: es rápida, requiere poca cantidad de sangre y puede ser útil en el seguimiento clínico de los pacientes con alta predisposición para desarrollar enfermedad invasiva por Candida.

Debemos tener presente, como es comentado por Matthews (16), que es la suma de resultados de diferentes pruebas de detección de Candida la solución al problema de diagnóstico de Candidosis invasiva.

En las siguientes fases de la prueba deberá ampliarse espectro de los casos estudiados utilizando nuevamente pacientes con manifestaciones típicas de la enfermedad, así como otras formas de presentación de la misma, haciendo el contraste con individuos sanos (controles); esto buscando definir si la prueba puede detectar otras variedades de la enfermedad (localizada, invasiva, y sistémica) y si es capaz de discriminar aquellos sujetos sin enfermedad (especificidad).

Buscando mejorar el estándar de oro es necesario incrementar la posibilidad de recuperar *Candida* en hemocultivos mediante el empleo de las técnicas recientemente descritas (Lisis y centrifugación, cultivo en BHI, etc. Ref 28), o con la detección en suero de sus antígenos y genoma (12, 29). Asimismo, en fases posteriores deberán tomarse un mayor número de muestras de IFA, a fin de tratar de alcanzar una mayor sensibilidad.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

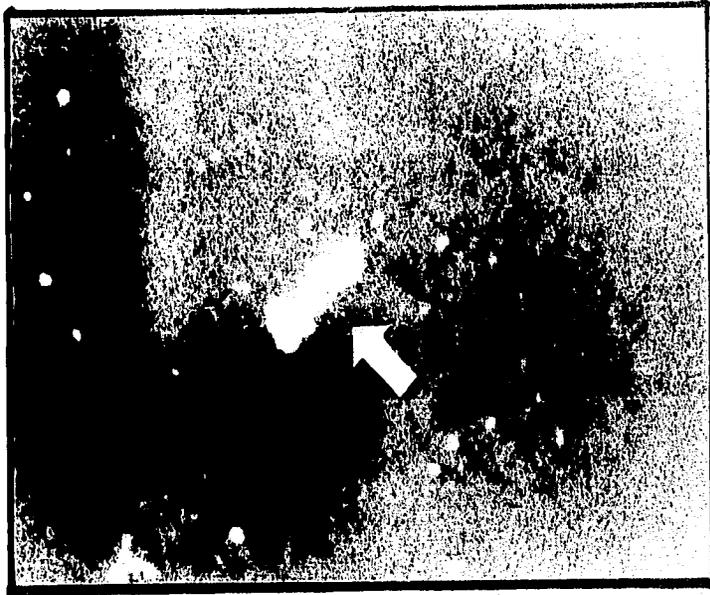


FIGURA 1: Observación de levaduras fluorescentes en un frotis de concentrado leucocitario de sangre periférica de conejo.



FIGURA 2: Observación de levaduras fluorescentes en gemación que sobresalen a la fluorescencia inespecífica. Muestra de sangre periférica de un paciente.

## **COROLARIO METODOLOGICO.**

Siempre que estudiamos una nueva prueba diagnóstica, aceptamos como válidas sólo a aquellas que han sido desarrolladas mediante el clásico estudio que considera todo el espectro de la enfermedad y que incluye controles permitiendo conocer sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo. Esto ha dado lugar a que en muchos casos, el desarrollo de una prueba diagnóstica se vuelva difícil, frustrante e inútil al no cumplir con todos los requisitos (27).

Para comprender la complejidad del desarrollo de una prueba diagnóstica, basta con hacer una analogía con el desarrollo de un nuevo tratamiento. Evidentemente, este se realiza gradualmente hasta que finalmente se utiliza en situaciones clínicas habituales. Aquellos fármacos que no superan este "tamizaje" no vale la pena probarlos en "Ensayos Clínicos". En el desarrollo de una prueba diagnóstica el razonamiento es similar; es decir, debe seguirse una secuencia ordenada y lógica en la que la prueba debe sortear varios retos antes de considerarse útil. Este concepto ya ha sido previamente mencionado por Feinstein y Nierenberg (25, 26), quienes sugieren que el desarrollo de una prueba diagnóstica debe seguir por lo menos 5 fases (Tabla 2).

**TABLA 2**  
**FASES EN EL DESARROLLO DE UNA PRUEBA DIAGNOSTICA.**

Fase	Casos	Controles	Propósito
I	Casos típicos.	No.	Estandarización.
II	Casos típicos.	Individuos sanos.	Sensibilidad y especificidad.
III	Se amplía el espectro.	Individuos sanos.	Distinción más sutil.
IV	Casos típicos y otras manifestaciones.	Diagnósticos diferenciales y sanos.	Aumenta el reto a la prueba.
V	Todo el espectro posible de pacientes en situaciones clínicas habituales. (Ensayo Clínico)		Valores predictivos.

Adaptada de: Feinstein y col. How to Evaluate a Diagnostic Marker  
Test, JAMA 1988; 259: 1699-1702.

**FASE I:** En esta fase se estandarizan los procedimientos de que consiste la prueba y nos permite conocer el momento óptimo de la toma del estudio, características y condiciones de las muestras, así como los aspectos farmacocinéticos según sea el caso. Los pacientes en estudio son aquellos que representan casos obvios o formas graves de la enfermedad. Si los resultados de esta fase son alentadores, debe pasarse a la siguiente (sensibilidad).

**FASE II:** En ella se estudian casos obvios de la enfermedad y se contrastan con controles sanos, nos permite una distinción "gruesa" entre presencia y ausencia de la enfermedad (sensibilidad y especificidad).

**FASE III:** Se amplía el espectro de la enfermedad a sus principales manifestaciones y variedades, se siguen utilizando controles sanos.

**FASE IV:** El espectro se abre tanto en los casos de enfermedad como en los controles, de manera que se incluyen los diagnósticos diferenciales más importantes de la enfermedad en estudio. En esta fase se evalúan las condiciones que pueden interferir con la prueba y que pudieran producir resultados falsos positivos y negativos. Además, se define si la prueba detecta sólo una variante de la enfermedad o algunas de sus formas de presentación.

**FASE V:** Es la equivalente al "Ensayo Clínico Controlado" y en ella la prueba se aplica en las condiciones clínicas en que habitualmente se indicaría su uso (valores predictivos positivo y negativo).

La secuencia descrita no implica rigidez metodológica, de manera que el desarrollo de algunas de las fases podría obviarse de acuerdo a los resultados que se obtengan. Así, la adecuada aplicación de estas fases nos ayuda a prevenir los problemas ocasionados cuando una prueba diagnóstica es utilizada antes de su correcta evaluación e interpretación. (27).

## CONCLUSIONES

- 1)** La Inmunofluorescencia indirecta (IFA) en concentrado leucocitario de una muestra de sangre detecta candidemia con mayor frecuencia que el hemocultivo en pacientes con factores de riesgo para Candidosis invasiva.
  
- 2)** La detección de candidemia mediante IFA del concentrado leucocitario de una muestra de sangre en pacientes con factores de riesgo para Candidosis invasiva probablemente apoye la decisión de iniciar tratamiento antifúngico, especialmente en aquellos sujetos con enfermedades hemato-oncológicas, neutropenia y fiebre.
  
- 3)** La detección de Candida mediante IFA en concentrado leucocitario de una muestra de sangre ofrece las siguientes ventajas: requiere poca cantidad de sangre y puede realizarse en pocas horas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Morrison, VA, Peterson VA y Bloomfield CD. Nosocomial Septicemia in Cancer Patient: The Influence of Central Venous Access Devices, Neutropenia and Type of Malignancy. **Med Pediatr Oncol** 1990; 18: 209-16.
- 2) Brown AE: Overview of Fungal Infections in Cancer Patients. **Semin Oncol** 1990; 3 (Suppl): 2-5.
- 3) Saral R. Candida and Aspergillus Infections in Immunocompromised Patients: An Overview. **Rev Infect Dis** 1991; 13: 487-92
- 4) Richet HV, Andreumont A, Tancrede C y col. Risk Factors for Candidemia in Patients with Acute Lymphocytic Leukemia. **Rev Infect Dis** 1991; 13: 211-15.
- 5) Pizzo PA, Walsh TJ. Fungal Infections in the Pediatric Cancer Patient. **Semin Oncol** 1990; 3 (Suppl): 6-9.
- 6) Bodey GP, Bueltmann B, Duguid W y col. Fungal Infections in Cancer Patients: An International Autopsy Survey. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 1992; 11: 99-109.
- 7) Frasser VJ, Jones M, Dunkel J y col. Candidemia in Tertiary Care Hospital: Epidemiology, Risk Factors and Predictors of Mortality. **Clin Infect Dis** 1992; 15: 414-21.
- 8) Bille J, Stockman L y Roberts GD. Detection of Yeast and Filamentous Fungi in Blood Cultures During a 10-Year Period (1972 to 1981). **J. Clin Microbiol** 1982; 16: 968-70.
- 9) Murray PR. Comparison of the Lysis-Centrifugation and Agitated Biphase Blood Cultures System for Detection of Fungemia. **J. Clin Microbiol** 1991; 29: 96-98

- 10) Burnle JP. Developments in the Serological Diagnosis of Opportunistic Fungal Infections. **J. Antimicrob Chemother** 1991; 28: 23-33.
- 11) Reiss E, de Repentigny L, Kuykendall RJ y col. Monoclonal Antibodies Against Candida Tropicalis Mannan: Antigen Detection by Enzyme Immunoassay and Immunofluorescence. **J. Clin Microbiol** 1986; 24: 796-802.
- 12) Walsh TJ, Hathorn JW, Sobel JD y col. Detection of Circulating Candida Enolase by Immunoassay in Patients with Cancer and Invasive Candidiasis. **N. Engl J Med** 1991; 324: 1026-31.
- 13) Obayasi, Yoshida M, Mori T y col. Plasma (1-3)-Beta-D-glucan Measurement in Diagnosis of Invasive Deep Mycosis and Fungal Febrile Episodes. **Lancet** 1995; 345: 17-20.
- 14) de Rentigny L. Serodiagnosis of Candidiasis, Aspergillosis and Cryptococcosis. **Clin Infect Dis** 1992; 14 (Suppl. 1): S 11-22.
- 15) Rinaldi MG. Problems in the Diagnosis of Invasive Fungal Diseases. **Rev Infect Dis** 1991; 13: 493-95.
- 16) Matthews RC: Early Diagnosis of Systemic Candidal Infection. **J Antimicrob Chemother** 1993; 31: 809-12.
- 17) Coppen MJ, Noble CJ, Aubery C. Evaluation of Buffy-Coat Microscopy for the Early Diagnosis of Bacteremia. **J Clin Pathol** 1981; 34: 1375-77.
- 18) Faden HS. Early Diagnosis of Neonatal Bacteremia by Buffy-Coat Examination. **J Pediatr** 1976; 88: 1032-34.
- 19) Ascuitto RJ, Gerber MA, Kates KL y Tilton RC. Buffy-Coat Smears of Blood Drawn Through Central Venous Catheters as an Aid to Rapid Diagnosis of Systemic Fungal Infections. **J Pediatr** 1985; 106: 445-47.
- 20) Cattermole HE y Rivers RP Neonatal Candida Septicaemia: Diagnosis on Buffy Smear. **Arch Dis Child** 1987; 62: 302-4.

- 21) Cabrera CI, Herrera SM, Diaz PH Utilidad de la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta en Extendidos Leucocitarios para el Diagnóstico de Candidosis Sistémica en un Modelo Animal. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. México 1994.
- 22) Taschdjian CL, Toni EF, Hsu KC y col. Immunofluorescence Studies of Candida in Human Reticuloendothelial Phagocytes: Implications for Immunogenesis and Pathogenesis of Systemic Candidiasis. **Am J Clin Pathol** 1971; 56: 50-58.
- 23) Young RC, Bennet JE y col. Fingemia with Compromised Host Resistance. **Ann Intern Med** 1974; 80: 605-12.
- 24) Khoo SH, Bond J y Denning Dw. Administering Amphotericin B a Practical Approach. **J. Antimicrob Chemother** 1994; 33: 203-13.
- 25) Nierenberg AA y Feinstein AR. How to Evaluate a Diagnostic Marker Test. **JAMA** 1988; 259: 1699-1702.
- 26) Ransohoff DF, Feinstein AR, Problems of Spectrum and Bias in Evaluating the Efficacy of Diagnostic Test. **N Engl J Med** 1978; 299: 926-30.
- 27) Feinstein AR, Carrington RM, Lachs MS y col. Use of Methodological Standards in Diagnostic Test Research. **JAMA** 1995; 274: 645-51
- 28) Murray PR, Comparison of the Lysis-Centrifugation and Agited Biphasic Blood Culture Systems for Detection of Fungemia. **J. Clin Microbiol** 1991; 29: 96-101.
- 29) Miyacawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y. New Method for Detection of Candida Albicans in Human Blood by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin Microbiol** 1994; 31: 3334.