



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,  
Odontológicas y de la Salud.**

**Título del trabajo:**

Rendimiento diagnóstico de un ensayo de PCR múltiple en pacientes con sospecha de candidiasis invasiva.

Que para optar por el grado de:

Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

**PRESENTA:**

Dra. María Fernanda González Lara.

**Tutor:** Dr. José Sifuentes Osornio

Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas “Salvador Zubirán”

Comité tutor:

Dr. Alfredo Ponce de León Garduño

Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas “Salvador Zubirán”

Dra. Patricia Cornejo Juárez

Instituto Nacional de Cancerología

**Ciudad de México, febrero de 2019**



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.

**Comité tutorial:**

Dr. José Sifuentes Osornio. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Dr. Alfredo Ponce de León Garduño. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Dra. Dora Patricia Cornejo Juárez. Instituto Nacional de Cancerología.

**Investigadores participantes:**

Dra. Rosa Areli Martínez Gamboa. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. Pedro Torres González. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Dra. Francisca Hernández Hernández. Departamento de Microbiología y Parasitología, recursos en Micología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Dra. Edith Sánchez Paredes. Departamento de Microbiología y Parasitología, recursos en Micología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Dr. Jorge Tovar-Torres. Royal Holloway University of London

Dra. Irene Castaño Navarro. Instituto Potosino de Tecnología y Ciencia.

Dr. Luis Ostrosky-Zeichner. Memorial Hermann Hospital. McGovern Medical School. University of Texas

## Índice

Resumen.....	Páginas 4-6
Marco Teórico.....	Páginas 7-11
Planteamiento del problema.....	Páginas 11-12
Justificación.....	Página 13
Metodología .....	Páginas 14-24
Resultados.....	Páginas 24-35
Discusión.....	Páginas 35-40
Conclusiones.....	Página 40
Referencias.....	Páginas 41-46
Agradecimientos.....	Página 47

## Resumen

**Antecedentes.** La candidiasis invasiva es un espectro de manifestaciones que incluyen candidemia y candidiasis con afección de sitios estériles. El método diagnóstico de referencia es el hemocultivo pero tiene una sensibilidad del 50%. Biomarcadores como el B-d glucano y mananos no han demostrado ser el marcador ideal. La amplificación de ADN de *Candida* mediante PCR es una alternativa que ofrece resultados en menor tiempo, con mayor sensibilidad en comparación con el hemocultivo; sin embargo los métodos no están estandarizados y no se han implementado de manera rutinaria en la práctica clínica. En México se han desarrollado 2 ensayos de PCR múltiple y un ensayo de PCR punto final, los cuáles no han sido validados con muestras clínicas. El objetivo del trabajo es determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de 2 ensayos de PCR múltiple y un ensayo de PCR punto final en pacientes con sospecha de candidiasis invasiva.

**Métodos.** Se realizó una búsqueda sistemática de pacientes consecutivos con sospecha de candidiasis invasiva hospitalizados en 2 Institutos Nacionales de Salud en la Ciudad de México. En aquellos que otorgaron consentimiento informado, se obtuvieron muestras de hemocultivo y sangre periférica para realizar PCR múltiple y punto final al momento de la inclusión, así como muestras de sangre periférica para realizar PCR punto final los días 3, 7 y 14 después de la inclusión. Se dio seguimiento por 30 días para designar al paciente como caso de candidiasis invasiva o control. Se analizó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de cada prueba.

**Resultados.** Entre enero de 2017 y mayo de 2018, se incluyeron a 75 pacientes de los cuáles 24 fueron considerados casos y 51 fueron considerados controles. Los ensayos de PCR múltiple reportaron resultados negativos en todos los casos y todos los controles. El ensayo de PCR punto final reportó una sensibilidad de 25%, especificidad de 60.7%, valor predictivo positivo de 20%, valor predictivo negativo de 67.4%. Se identificaron dos factores relacionados a una baja sensibilidad de las pruebas: baja sensibilidad analítica, tiempo de tratamiento antifúngico previo a la inclusión y predominio de pacientes con candidiasis de origen extravascular.

**Conclusión.** Los ensayos de PCR múltiple no tuvieron la capacidad de amplificar DNA de *Candida*. El PCR punto final tuvo una sensibilidad y especificidad inferior al cultivo en pacientes con sospecha de candidiasis invasiva. Lo anterior se debe probablemente a la baja sensibilidad analítica de la prueba, el predominio de pacientes con candidiasis de origen extravascular y al antecedente de haber recibido tratamiento antifúngico previo a la toma de la muestra.

## **Abstract**

**Background.** Invasive candidiasis includes candidemia and deep-seated candidiasis in the spectrum of disease. The gold standard for diagnosis is the blood culture which is 50% sensitive. Other biomarkers such as B-d glucan and mannan/antimannan tests are not the ideal markers. DNA amplification through PCR is a faster, more sensitive alternative compared to blood culture. However, the methods are not standardized and are not used routinely in clinical practice. Two essays of multiple PCR and one conventional PCR essay for *Candida* have been developed in Mexico, but they have not been validated with clinical samples. Our main purpose was to determine the sensitivity, specificity and predictive values of the multiple PCR and conventional PCR essays on patients with suspected invasive candidiasis.

**Methods.** A systematic search for patients with suspected invasive candidiasis was performed in two National Institutes of Health in Mexico City. In those who gave consent, peripheral blood samples for culture and PCR were taken on inclusion. Other peripheral blood samples for PCR were taken on days 3, 7 and 14 after inclusion. Patients were followed during 30 days to classify them in cases of invasive candidiasis or controls. We estimated sensitivity, specificity and predictive values

**Results.** 75 patients were included between January 2017 and May 2018, of which 24 were diagnosed with invasive candidiasis and 51 were considered controls. The multiple PCR essays showed negative results in all cases and controls. The conventional PCR showed 25% sensitivity, 60.7% specificity, 20% positive predictive value and 67.4% negative predictive value. We identified the following factors related to the low overall sensitivity: A low analytic sensitivity, the time on antifungal therapy

before inclusion and the predominance of patients with invasive candidiasis from extravascular sources.

**Conclusion.** *Candida* DNA could not be amplified by the multiple PCR essays, whereas conventional PCR showed a lower sensitivity compared to blood cultures. These results were probably related to a low analytical sensitivity, patients receiving antifungal therapy prior to inclusion and the predominance of invasive candidiasis from extravascular sources.

## **1. Marco teórico y antecedentes.**

La candidiasis invasiva es la micosis invasiva más común y su incidencia ha incrementado en las últimas décadas por diversos factores, como son: el aumento en el número de pacientes inmunosuprimidos, mayor edad de los pacientes, uso diseminado de antibióticos de amplio espectro, entre otros factores de riesgo (1, 2)

Más de 250,000 personas sufren esta condición a nivel mundial cada año y más de 50,000 fallecen.(3) La incidencia de candidemia se ha reportado de 0.17-0.76 casos por 1,000 ingresos en Europa, 0.28-0.96 casos por 1,000 ingresos en EUA y 1.66-5.3 en Latinoamérica.(4-6) En México, en un estudio reciente en dos Institutos Nacionales, se calculó una incidencia de 4 casos por 1,000 ingresos lo que representa una mayor carga de enfermedad en comparación con Norteamérica y con la mayor parte de Latinoamérica. (7, 8)

Hasta el 50% de estas infecciones ocurren en pacientes críticos.(9) En un estudio de infecciones nosocomiales en las unidades de terapia intensiva (UTI) se encontró una prevalencia de 17% de infecciones por *Candida* spp. (10) Además, se ha descrito una incidencia 10 veces mayor de candidemia en pacientes críticos que su contraparte de pacientes médicos, con 3-15 episodios por 100,000 días paciente y 5-10 casos por 100,000 admisiones a UTI.(11) La incidencia en general de candidiasis invasiva en pacientes críticos es de 1.8-3.7%.(12-14)

Se han descrito múltiples factores de riesgo relacionadas con esta condición como son: enfermedad crítica con estancia prolongada en unidades de cuidados intensivos, cirugía abdominal con infecciones intraabdominales, pancreatitis aguda, trasplante de órgano sólido, neoplasias sólidas o hematológicas, neutropenia, uso de antibióticos de amplio espectro, hemodiálisis, uso de esteroides o quimioterapia y colonización por *Candida* spp.(3)

La candidiasis invasiva puede manifestarse como infección del torrente sanguíneo (ITS), la cual representa hasta el 9% de todas las ITS; o como afección a órganos profundos, (deep-seated candidiasis) que puede ser secundaria a la diseminación

hematógena del hongo o la introducción de levaduras colonizantes hacia espacios estériles por alguna otra razón (cirugía, trauma, inmunosupresión).(15)

Las manifestaciones clínicas suelen ser inespecíficas y consisten en síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis grave, choque séptico y signos derivados de la afección de órganos blanco como son: endoftalmitis, endocarditis, tromboflebitis séptica, microabscesos renales o hepatoesplénicos, entre otros. El diagnóstico de infección probada, de acuerdo a los criterios de la EORTC(16), requiere la evidencia histopatológica o por examen directo de levaduras en una muestra tomada de un sitio estéril, el crecimiento en un cultivo de un líquido estéril o el aislamiento de especies de candida en un hemocultivo (candidemia).

El estándar de oro para el diagnóstico de candidemia es el hemocultivo; sin embargo la sensibilidad reportada para este método es de alrededor del 50% (21-71% en estudios de autopsia) y la mediana de tiempo para la detección es de 2-3 días y hasta 4 semanas. El estándar de oro para el diagnóstico de candidiasis invasiva con afección orgánica es el cultivo positivo tomado de sitios estériles. La sensibilidad de dichos cultivos suele ser de 42% y se ve limitada por la necesidad de obtenerse mediante procedimientos invasivos y errores de muestreo. Por otro lado, la capacidad del hemocultivo para la detección de candidemia depende de la viabilidad de las levaduras en el torrente sanguíneo, siendo ésta mucho mayor en infecciones relacionadas a dispositivos intravasculares o en infecciones por *C. tropicalis*, que en infecciones asociadas a traslocación intermitente de levaduras a partir del tracto digestivo como suele ser la infección relacionada con *C. albicans* o *C. glabrata*.(15, 16)

Se han diseñado pruebas diagnósticas basadas en la detección de antígenos de pared como B-D-glucano, los anticuerpos anti-tubo germinal o antimanano. El B-D glucano es el que más se utiliza y es incluso recomendado por algunas guías en la definición del tratamiento empírico (ESCMID). La sensibilidad y especificidad de la prueba se ha reportado en 57-96% y 56-93%, respectivamente. En un meta-análisis

reciente se estableció una sensibilidad del 75% y especificidad de 85% en pacientes con candidiasis invasiva probada o probable.(17) La tasa elevada de falsos positivos por diversos factores ha limitado su implementación (hemodiálisis, administración de derivados sanguíneos, albúmina humana, material quirúrgico que contiene glucano, antibióticos como amoxicilina/clavulanato o piperacilina/tazobactam, infecciones bacterianas y mucositis grave, en sujetos de alto riesgo).

El uso de modelos de riesgo ha permitido discriminar a los pacientes de alto y bajo riesgo para desarrollar candidiasis invasiva de acuerdo con la presencia de factores de riesgo. Diversas reglas de predicción (Paphitou, Ostrosky-Zeickner, Candida Score, NMC) en pacientes críticos han mostrado una sensibilidad de entre 40-84%, una especificidad entre 60-81%, valor predictivo positivo de 4-69% y valor predictivo negativo entre 98 y 99%. La regla de predicción de NMC es la que ha alcanzado la mayor sensibilidad (84%) y especificidad de 60%. Esta escala se llevó a cabo en una población de pacientes críticos con una incidencia de 23 casos por 1,000 días paciente en UTI y una prevalencia elevada de pacientes inmunosuprimidos, con trasplante de órgano sólido y hematopoyético. Los factores que se consideraron en su ecuación fueron los siguientes: uso de antibióticos de amplio espectro, presencia de catéter venoso central, nutrición parenteral total, uso de esteroides, cirugía abdominal y estancia hospitalaria. Debido a su alto valor predictivo negativo, son útiles para identificar a los pacientes que no se benefician de recibir tratamiento antifúngico empírico. Sin embargo, su bajo valor predictivo positivo no ha permitido identificar adecuadamente a aquellos individuos que se benefician de recibir el tratamiento en la mayoría de los estudios. Siguiendo los criterios de las distintas reglas de predicción tan solo el 4.1-5.4% de los pacientes son seleccionados para recibir profilaxis. (12-14) Además, los modelos de predicción cuentan con otras limitaciones como son: estar basados en el hemocultivo como estándar diagnóstico, otros cultivos laboriosos que tardan 2-3 días en arrojar resultados sobre colonización multifocal y la baja capacidad de ser generalizables a la práctica diaria

debido a la selección de los pacientes en cada uno de los estudios y las diferencias que existen entre las poblaciones.(18)

Por otro lado, los estudios que han evaluado el uso dirigido de antifúngicos en pacientes de alto riesgo, de acuerdo con las distintas reglas de predicción han mostrado resultados inconsistentes. Estudios aleatorios mostraron la ineffectividad del tratamiento empírico con fluconazol o equinocandinas en pacientes críticos de alto riesgo para desarrollar candidiasis invasiva.(19, 20) mientras que en otros estudios fluconazol mostró ser el fármaco más costo efectivo para reducir la incidencia de CI.(21) Por el otro lado, se ha descrito un curso favorable en pacientes que recibieron tratamiento empírico con equinocandinas, incluso cuando no se demostró la presencia de *Candida* spp en cultivos diversos.(22) Un ensayo clínico aleatorio, doble ciego no mostró disminución en la incidencia de candidiasis invasora utilizando una caspofungina de manera profiláctica o anticipada en sujetos de alto riesgo de acuerdo al modelo de predicción de Ostrosky-Zeichner. (23)

Recientemente se ha sugerido el uso de PCR para la detección temprana de ADN de *Candida* spp en sangre periférica. En un meta-análisis se reportó una sensibilidad y especificidad de 95 y 92%, respectivamente, al comparar pacientes con candidemia con pacientes en riesgo de desarrollar candidemia.(24) En los casos de candidiasis invasiva probable se encontró una sensibilidad de 85%. Además, diversos estudios han mostrado que un resultado positivo de PCR precede a un hemocultivo positivo entre 1 día y 4 semanas. Se ha reportado que un resultado positivo de PCR permite el inicio tratamiento antifúngico desde 6 horas después del diagnóstico de sepsis.(25)

Un estudio de Nguyen(26) comparó la sensibilidad del hemocultivo, B-D glucano y PCR en pacientes con candidiasis invasiva sin candidemia y se encontró una sensibilidad de 17, 62 y 88%, respectivamente, lo que favorece el uso de PCR para identificar pacientes no diagnosticados mediante hemocultivo. Fortun et al,(27) mostraron recientemente que la sensibilidad de un ensayo de PCR múltiple es >90% en 4 escenarios distintos que incluyen pacientes en UTI altamente colonizados por

*Candida* spp, en comparación con el hemocultivo. A pesar de que la diferencia en la sensibilidad no alcanza diferencia estadística, la tendencia a un mejor rendimiento diagnóstico es aún mas acentuada en el escenario de infección a órganos profundos (deep-seated candidiasis). Si bien la sensibilidad del PCR es similar a la del ensayo de B-D glucano, se sugiere el uso del primero por la baja frecuencia de falsos positivos tanto en controles sanos como individuos colonizados. Por otro lado, los resultados de PCR persistentemente positivos se han relacionado con mayor mortalidad, lo que sugiere un papel en el seguimiento y respuesta al tratamiento.(24)

Hasta ahora el hemocultivo sigue siendo el estándar diagnóstico con su limitante de baja sensibilidad y diagnóstico tardío, por lo que un método con un mejor rendimiento diagnóstico con alta sensibilidad, especificidad que arroje resultados en un periodo de tiempo menor, como es el PCR, es deseable. Sin embargo, aun no se ha estandarizado el método ni se ha alcanzado validez en estudios multicéntricos, lo que abre la puerta a continuar haciendo ensayos prospectivos. A pesar de la disponibilidad de antifúngicos, la mortalidad sigue siendo elevada (hasta 50%), debido al retraso en el diagnóstico y en el tiempo de administración del tratamiento adecuado.

## **2. Planteamiento del problema**

La incidencia de candidiasis invasiva ha incrementado de manera global en las últimas décadas; en México, en un estudio de vigilancia basada en laboratorio que incluyó pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) y el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), se encontró una incidencia mayor a la reportada en EUA y Europa (4 casos por 1, 000 ingresos vs. 1 caso por 1,000 ingresos). Los pacientes que presentan esta patología suelen ser pacientes críticamente enfermos con múltiples comorbilidades y diversos grados de inmunosupresión. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas y se asocian con sepsis grave y choque séptico. Diversos factores se han relacionado con un mal pronóstico en estos enfermos, como son la presencia de cirrosis, neutropenia y un

retraso en el inicio de tratamiento antifúngico apropiado. Lo anterior se refleja en una mortalidad elevada de 40-70%.

El diagnóstico de candidiasis invasiva se basa en cultivo de sangre o líquidos estériles; sin embargo la sensibilidad de dichos métodos varía entre 40 y 50% respectivamente, y arrojan un resultado en 3-7 días, lo que retrasa en el inicio de tratamiento apropiado.

El uso de biomarcadores como B-d glucano y la implementación de reglas de predicción con puntajes clínicos permiten distinguir a pacientes de bajo riesgo por su alto valor predictivo negativo, sin embargo hasta ahora no se ha encontrado un método que identifique a los pacientes de alto riesgo o con candidiasis invasiva de manera temprana y certera. Por otro lado, el uso de B-d glucano se ha limitado por el costo elevado y la alta tasa de falsos positivos.

En México, investigadores del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) desarrollaron un ensayo de PCR múltiple en tiempo real que identifica a las 4 especies de *Candida* más frecuentes: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

Por otro lado, investigadores del Centro de Ciencias Biomédicas de la Royal Holloway University de Londres desarrollaron otro ensayo de PCR múltiple en tiempo real que identifica a las siguientes especies: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. auris*.

Finalmente en el Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas “Salvador Zubirán” desarrollamos un ensayo de PCR punto final que amplifica las regiones ITS4 y D1-D2 (NL) y permite la identificación de *Candida spp.*

Todos los ensayos han sido validados con muestras de cultivos positivos para *Candida spp.*, así como con muestras de hemocultivo inoculadas con concentraciones conocidas de *Candida spp.* Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado su rendimiento diagnóstico en muestras de pacientes con sospecha de candidiasis invasiva.

## **Justificación**

Ante la creciente incidencia de candidiasis invasiva, la transición epidemiológica hacia especies de *Candida* no albicans y la alta mortalidad relacionada, es necesario contar con mejores métodos diagnósticos para candidiasis invasiva, debido a las múltiples limitaciones de los métodos actuales. Dentro de las características del método diagnóstico ideal se encuentran una mayor sensibilidad con alta especificidad, que brinde resultados de manera oportuna (menos de 24 horas) y que brinde información sobre la susceptibilidad a antifúngicos de manera oportuna. La amplificación de DNA de *Candida* mediante PCR en muestras de sangre, podría cumplir con esas características.

Es conocido que la técnica de PCR tiene una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de candidiasis invasiva cuando se utilizan los blancos moleculares conocidos, sin embargo, existen mas de 100 ensayos de PCR en la literatura, que no se han estandarizado. En México y en el Reino Unido se han desarrollado dos ensayos de PCR múltiple y un ensayo de PCR punto final, que han sido estudiados con muestras de cultivos positivos o botellas de hemocultivo inoculadas con *Candida*. Sin embargo, dichos ensayos aún no han sido validados con muestras clínicas de pacientes con sospecha de candidiasis invasiva. Antes de utilizarlos como estudios clínicos de diagnóstico, es necesario conocer su rendimiento.

## **3. Metodología**

### **3.1 Hipótesis**

La detección de ADN de *Candida* spp mediante PCR múltiple tendrá una sensibilidad mayor y especificidad > 90% en comparación con la definición establecida de candidiasis invasiva.

### **3.2 Objetivos**

**Objetivo principal:** Determinar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de dos ensayos de PCR múltiple en pacientes con sospecha de candidiasis invasiva

**Objetivos secundarios:**

1. Evaluar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de 2 ensayos de PCR múltiple en el subgrupo de pacientes con candidiasis invasiva profunda
2. Evaluar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de 2 ensayos de PCR múltiple en el subgrupo de pacientes con candidiasis invasiva probada
3. Comparar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de 2 ensayos de PCR múltiple con un ensayo de PCR punto final.
4. Evaluar el tiempo de persistencia del DNA de *Candida* en sangre medida por el ensayo de PCR punto final en casos de candidiasis invasiva posterior al inicio del tratamiento.
5. Evaluar si la persistencia del DNA de *Candida* medida por el ensayo de PCR punto final se relaciona con mayor mortalidad.

### **3.3 Diseño del estudio**

Estudio de prueba diagnóstica, prospectivo, doble ciego, multicéntrico

### **3.4 Población en estudio**

Los pacientes que cumplieron los siguientes criterios fueron incluidos:

- Mayores de 18 años.
- Hospitalizados en áreas críticas o médicas del INCMNSZ y el INCAN.
- Que cumplieron con la definición establecida de sospecha de candidiasis invasiva
- Que otorgaron consentimiento informado (paciente o familiar responsable).

Se excluyó a los siguientes pacientes:

- Diagnóstico de candidiasis invasiva > 72 horas antes de la inclusión
- Que recibieron tratamiento antifúngico durante mas de 72 horas previo a la inclusión en los últimos 14 días

### **3.5 Recopilación de la información**

Se realizó una búsqueda sistemática de pacientes con sospecha de candidiasis invasiva entre los pacientes hospitalizados en el INCMNSZ y el INCAN visitando diariamente las áreas críticas y 3 veces por semana en los pisos de hospitalización. Se realizó muestreo de pacientes consecutivos. Después de obtener el consentimiento informado del paciente o familiar responsable, se tomaron muestras de sangre para realizar hemocultivo y PCR (día 0). Las muestras para PCR se tomaron en sangre periférica en un tubo con EDTA de 8 ml y un tubo de citrato de sodio de 5 ml.

Además, se solicitó un índice de colonización para establecer la presencia de colonización por *Candida*. Para ello se tomaron 5 muestras, entre las siguientes posibilidades: cultivo de exudado faríngeo o nasal, axilar, perianal, orina, exudado de herida de catéter y/o exudado de herida quirúrgica.

Las muestras de sangre para PCR múltiple tomadas en el INCAN fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ en donde se realizó extracción de ADN conforme llegaron. Las muestras de ADN fueron enviadas al departamento de Micología de la Facultad de Medicina de la UNAM y al IPICYT para realizar PCR

múltiple. En el INNCMSZ se realizó el ensayo de PCR punto final. El resultado del PCR (múltiple o punto final) se reportó como positivo o negativo.

Las muestras de hemocultivo se procesaron de acuerdo con el procedimiento habitual del laboratorio de Microbiología. Se repitió la toma del hemocultivo al día +3 (en aquellos con hemocultivo inicial positivo), como es el estándar de cuidado para descartar candidemia persistente.

Posteriormente, se tomaron muestras de sangre periférica en tubo de EDTA (8 ml) para realizar PCR punto final al día +3, +7, +14.

La información se registró en un formato estandarizado de reporte de caso. Se le dio seguimiento a cada paciente de manera prospectiva durante 30 días. Al final del seguimiento se clasificó al paciente como caso de CI o control. Además, se obtuvo información demográfica, clínica y sobre el tratamiento a partir del expediente.

Los resultados de cultivo se informaron al médico tratante de manera oportuna por la vía habitual, mientras que los resultados de PCR no fueron informados ni alteraron el tratamiento recomendado por el grupo médico. El tratamiento de los pacientes se estableció de acuerdo al criterio del médico tratante. El resultado del PCR se interpretó de manera ciega, sin conocer el resultado del hemocultivo o la información clínica del paciente.

### **3.6 Definición de variables.**

**Variable dependiente:** Resultado de PCR positivo

**Sospecha de Candidiasis Invasiva:**

Se consideró a un paciente sospechoso candidiasis invasiva si presentó los siguientes 2 criterios:

1. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) de acuerdo a la definición de Surviving Sepsis.(28)

2. Puntaje positivo en la escala de Nebraska Medical Center y/o Ostrosky-Zeichner-2.(12)

- a. Se consideró un resultado positivo de la escala de **NMC** con un puntaje >2.45, de acuerdo a la siguiente ecuación:  $(1.537 \times \text{Abx D1-D3}) + (0.873 \times \text{CVC D1-D3}) + (0.922 \times \text{NPT D1-D3}) + (0.402 \times \text{esteroide D-7 D3}) + (0.879 \times \text{Cx abdominal}) + (0.039 \times \text{estancia preUTI})$
- b. Se consideró un resultado positivo de la escala de **Ostrosky-Zeichner** cuando se presentaron de manera simultánea 4 criterios obligatorios: (Estancia hospitalaria >4 días, ventilación mecánica >48 horas, presencia de catéter venosos central en los días 1-3, uso de antibióticos de amplio espectro en los días 1-3) mas uno de los siguientes: nutrición parenteral total en los días 1-3, diálisis en los días 1-3, inmunosupresores o esteroides en los días -7 a 0, pancreatitis aguda en los días -7 a 0, cirugía mayor en los días -7 a 0.

**Síndrome de Respuesta inflamatoria sistémica.** Mas de uno de los siguientes:(28)

- Temperatura >38°C o <36°C
- Frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto
- Frecuencia respiratoria >20 respiraciones por minuto o PaCO<sub>2</sub> < 32 mmHg.
- Alteración del estado mental
- Balance hídrico positivo (>20 ml/Kg en 24 horas)
- Hiperglicemia >140 mg/dL en ausencia de diabetes mellitus.
- Cuenta de leucocitos en sangre >12,000 cel/mm<sup>3</sup>, < 4,000 cel/mm<sup>3</sup> o >10% bandas.
- Elevación de proteína C reactiva 2 desviaciones estándar por arriba del valor normal.

**Candidiasis invasiva probada:** Alguno de los siguientes 3 criterios.

- a) Candidemia (cultivo de sangre con crecimiento de *Candida spp.*)

- b) Candidiasis Invasiva profunda (crecimiento de *Candida* o evidencia histopatológica de levaduras en muestras de líquidos estériles como líquido intraabdominal, pleural, biopsia de tejido estéril o absceso obtenido mediante punción)
- c) Hallazgo de microabscesos hepatoesplénicos en hígado y/o bazo con elevación de fosfatasa alcalina en un huésped neutropénico.

**Candidiasis invasiva probable:** Caso incluido por sospecha de candidiasis invasiva que cumpla el criterio de mejoría clínica tras 14 días del inicio de tratamiento antifúngico, habiendo descartado causas adicionales de sepsis.

**Mejoría clínica:** Se consideró criterio de mejoría clínica en aquellos pacientes que después de 14 días del inicio de antifúngico empírico presentaron resolución de los signos y síntomas sospechosos de CI, atribuido al inicio de tratamiento antifúngico.

**Disfunción orgánica:** Presencia de alguna de las siguientes:(28)

- Hipoxemia arterial:  $PaO_2/FiO_2 < 300$ .
- Oliguria  $< 0.5$  ml/Kg por hora después de 2 horas de reanimación hídrica adecuada.
- Elevación de creatinina  $> 0.5$  mg sobre el nivel basal.
- Alteraciones de coagulación:  $INR > 1.5$ ,  $TTP > 60$  s
- Íleo (ausencia de peristalsis)
- Trombocitopenia  $< 100,000$
- Hiperbilirrubinemia: Bilirrubina total  $> 4$ mg/dL

**Caso (verdadero positivo):** Se consideró como caso a aquellos pacientes que fueron incluidos por sospecha de candidiasis invasiva y que durante la evolución cumplieron con la definición de candidiasis invasiva probada o probable.

**Control (verdadero negativo):** Se consideró como controles a aquellos pacientes que fueron incluidos por sospecha de candidiasis invasiva y quienes presentaron una causa de la sepsis alternativa a candidiasis invasiva probada o probable.

**Colonización por *Candida spp*(29):** Se consideró a un paciente colonizado cuando se encontraron 3 cultivos positivos de los 5 tomados de las siguientes regiones: urocultivo, exudado nasal o faríngeo, exudado axilar, exudado de herida de catéter, exudado de herida quirúrgica o exudado perianal.

#### **Variables independientes.**

- Edad
- Sexo
- Comorbilidades: Diabetes Mellitus, neoplasia sólida o hematológica, cirrosis, cardiopatía, enfermedad renal crónica, pancreatitis.
- Factores de riesgo presentes en los 14 días previos:
  - Presencia de acceso venoso central
  - Uso de nutrición parenteral total
  - Antecedente de cirugía
  - Cirugía abdominal
  - Uso de antibióticos de amplio espectro
  - Uso de esteroides o inmunosupresores
  - Uso de quimioterapia
  - Presencia de ventilación mecánica invasiva
  - Terapia sustitutiva renal de urgencia
  - Pancreatitis
  - Presencia de sonda urinaria
  - Presencia de candiduria
  - Colonización por candida spp
- APACHE II.
- Sepsis grave: De acuerdo a la definición de Surviving Sepsis. La presencia de respuesta inflamatoria sistémica.

### **3.7 Análisis estadístico**

Se realizó análisis descriptivo de las variables demográficas y clínicas. Se utilizaron porcentajes, media, desviación estándar, mediana, percentiles y rangos intercuartilares de acuerdo al tipo de variable.

Se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para los distintos escenarios: candidiasis invasiva, candidiasis invasiva probada, candidiasis invasiva profunda

Al lograr la inclusión de la mitad de los pacientes se realizó un análisis intermedio en donde se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo para PCR.

El tamaño de la muestra se calculó con la siguiente fórmula para sensibilidad y especificidad adecuada:(30)

$$N = Z^2 * P (1-P)$$

$$\frac{\quad}{\Delta^2}$$

Se estableció una prevalencia de candidiasis invasiva de 10%, considerando la reportada en los estudios de validación de las reglas de predicción de Nebraska Medical Center y Ostrosky-2.(12)

Estimamos una sensibilidad del ensayo de PCR múltiple en 95%, especificidad en 92%(24) y una precisión del 5%, de tal manera que se proyectó incluir a 72 pacientes con la enfermedad para el análisis de sensibilidad y 113 pacientes para el estudio de especificidad.

### **3.8 Procedimientos de laboratorio**

#### **Cultivos convencionales**

**Hemocultivos:** La muestra de sangre periférica se inoculó en botellas BACTEC ( Becton Dickinson) y se incubó en el sistema automatizado Fx (Becton Dickinson). En el momento en que un hemocultivo se detectó como positivo, la botella se extrajo del equipo y se realizó frotis. En caso de encontrar levaduras, se realizó resiembra

en agar Saboraud. Se identificaron todas las cepas de levaduras a nivel de especie en base a la morfología microscópica en agar Sabouraud, y agar harina de maíz Tween 80, pruebas bioquímicas usando el sistema automatizado Vitek2 (BioMérieux AS, Marcy l'Étoile, Francia).

**Urocultivo o cultivo de orina por sonda:** La muestra fue sembrada en agar con cefoperazona (CFP) o sangre. Cuando el cultivo presentó desarrollo de colonias sugestivas de levaduras en 72 horas, se realizó frotis. En caso de observar levaduras, se realizó prueba de tubo germinal y si presentaba > 1,000 unidades formadoras de colonias (UFC) se consideró positivo.

**Exudado faríngeo o nasal:** La muestra tomada con un hisopo fue sembrada en agar CFP. Si el cultivo presentaba en 72 horas, desarrollo de colonias sugestivas de levaduras se realizó frotis. En caso de observar levaduras, se realizó prueba de tubo germinal y si presentó desarrollo > a 1 UFC, se consideró positivo.

**Cultivo de exudado de herida:** La muestra tomada con un hisopo fue sembrada en agar CFP. Si el cultivo presentaba en 72 horas desarrollo de colonias sugestivas de levaduras se realizó frotis. En caso de observar levaduras, se realizó prueba de tubo germinal y si presentó desarrollo > a 1 UFC, se consideró positivo.

Se realizó el mismo procedimiento para las muestras de hisopado perianal, hisopado axilar. Si mas de 3 de 5 cultivos arrojaron un resultado positivo, el índice de colonización se consideró positivo.(31)

### **Muestras para PCR**

**Extracción de DNA.** Consiste en la obtención y purificación de ADN fúngico del núcleo celular, a partir de una muestra de sangre periférica, tomada en un tubo de EDTA y uno de citrato de sodio.

El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: Los eritrocitos se lisaron con una solución de Tris 10 mM [pH 7,6], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, NaCl 10 mM y los leucocitos con un buffer de lisis de 10 mM de Tris [pH 7,6], 10 mM EDTA, NaCl 50 mM, 0.2% de dodecil sulfato de sodio y 200 mg de proteinasa K por ml. Las muestras se incubaron con NaOH 50 mM a 95 °C durante 10 minutos, y se neutralizaron con Tris 1 M, pH 7,0. Posteriormente, los sedimentos se incubaron con 500 µL de Solución

de Zimoliasa a 300 mg por ml, 50 mM Tris [pH 7,5], EDTA 10 mM, 28 mM b-mercaptoetanol a 37°C por 45 min. Después de una etapa adicional de centrifugación, se continuará con la extracción mediante el uso del kit QIAmp Tissue (Qiagen, Los Ángeles, Calif.), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

### **PCR punto final (convencional) para la detección de DNA de *Candida spp***

Esta técnica consiste en la amplificación de ADN a partir de secuencias conocidas de oligonucleótidos, que después de correr sobre un gel de agarosa y separar los productos del PCR por peso molecular, se interpretan de manera cualitativa.

El procedimiento realizado fue el siguiente: Se realizó amplificación de dos regiones del genoma de *Candida*, la región ITS y la región D1-D2 de manera simultánea. Para ello se utilizaron dos pares de oligonucleótidos: Para amplificar la región ITS se usaron los oligonucleótidos **ITS-5F** (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) y **ITS-4R** (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) y para amplificar la región NL se utilizaron los oligonucleótidos: **NL1F** (5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG -3') y **NL4R** (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G -3')

La PCR se realizará en un volumen final de 50 µL con las siguientes concentraciones: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 100 µM, ITS5F 0.5 µM, ITS4R 0.5 µM, Taq Polimerasa 1.5U y se usarán 10 µL de DNA de la muestra. Las condiciones de amplificación serán: 5 min a 98°C; 35 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 45s y un paso final de 72°C por 7 min. Los productos de la PCR se revisarán en un gel de agarosa al 1.5%, y se usará el marcador de peso molecular de 100 pares de bases como marcador de referencia. (32)

### **PCR Múltiple (en tiempo real)**

Esta técnica consiste en la amplificación de DNA a partir de secuencias de oligonucleótidos conocidos, y de manera simultánea cuantificar el producto de amplificación mediante fluoróforos que son detectados en una termocicladora con sensores de fluoresceína. La medición se realiza en cada ciclo de amplificación, mediante el análisis de las curvas de disociación y determinación del ciclo umbral (Ct)

Se realizó PCR múltiple para blancos específicos de cada especie de *Candida*. A continuación, se describen los blancos moleculares del ensayo de PCR múltiple a realizar en el IPICYT (Comunicación personal, datos sin publicar. Dra. Irene Castaño)

**A) Identificación por PCR: *Candida glabrata***

- Tres juegos de oligonucleótidos para detectar *Candida glabrata*:

Cg1, Cg2 y Cg3

Los tres juegos se alinean en regiones intergénicas.

Tamaño de los productos:

Cg1: 136 bp y 140 bp (oligo Fw: 242, Rv: 245)

Cg2: 327bp, 348bp y 364bp

Cg3: 601 bp y 664 bp

**B) Identificación de *Candida albicans***

- Tres juegos de oligonucleótidos para detectar *Candida albicans*: Ca2, Ca5 y

Ca6

Ca2: 202 bp.

Ca5: 203 bp.

Ca6: 173 bp.

**C) Identificación de *Candida parapsilosis***

- Dos juegos de oligonucleótidos para detectar *Candida parapsilosis*: Cp1 y

Cp2

Cp1: 311 bp.

Cp2: 174 bp.

**D) Identificación de *Candida tropicalis***

- Tres juegos de oligonucleótidos para detectar *Candida tropicalis*: Ct1, Ct3 y

Ct5

Ct1: 217 bp.

Ct3: 224 bp.

Ct5: 254 bp.

#### **4. Aspectos éticos.**

El protocolo fue sometido a evaluación y aprobación de los comités de Ética e Investigación del INCMNSZ y el INCan.

Se obtendrá consentimiento informado del paciente o familiar responsable antes de la inclusión al estudio

#### **5. Resultados**

##### **5.1 Análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas**

Entre enero de 2017 y mayo de 2018 se invitaron a 91 pacientes, de los cuáles 75 (82.4%) firmaron el consentimiento informado, 49/75 (65.3%) pacientes provenían del INCMNSZ y 26/75 (34.6%) provenían del INCAN.

De acuerdo a los criterios de inclusión, todos los pacientes presentaban SRIS y 74 tenían al menos una de las reglas de predicción positivas:

- 98.6% (74/75) la regla de NMC positiva
  - Un paciente con candidemia no cumplió con ninguna de las dos reglas de predicción y fue incluido
- 42.2% (30/75) tenían la regla de Ostrosky2 positiva.
  - El principal criterio por el cual no cumplieron con esta regla de predicción fue la necesidad de ventilación mecánica por 48 horas

Las características demográficas de los pacientes incluidos se resumen en la tabla 1 Los pacientes tenían una media de edad de 46 años (DE 16.1), una mediana de puntaje de APACHE II de 15 puntos (RIC 10-19) y 40% (30/75) eran de sexo masculino. De los principales factores de riesgo para desarrollar candidiasis invasora, los mas frecuentes fueron: presencia de catéter venoso central 98.6% (73/75), antecedente de cirugía 65.3% (49/75), ventilación mecánica invasiva 50.6% (38/75), nutrición parenteral total 49.3% (37/75), estancia en unidad de cuidados

intensivos en 49.3% (37/75), quimioterapia en 40% (30/75) y neutropenia en 29.3% (22/75). No se encontraron diferencias significativas entre las características basales de los casos con candidiasis invasiva, en comparación con los controles.

El 88% (66/75) de los pacientes recibieron tratamiento antifúngico, el 100% (24/24) de los casos y 82% (42/51) de los controles ( $p=0.02$ ). El tratamiento inicial más frecuente fueron las equinocandinas en 66% (44/66), seguido de fluconazol en 24% (16/66). Se administró tratamiento antifúngico con una mediana de 11 días (6-16) y este fue significativamente más largo en los casos que en los controles (mediana de 14 versus 7.5,  $p=0.0001$ )

La mortalidad a 30 días de los pacientes incluidos fue de 26.6% (20/75), sin encontrar diferencia significativa entre casos y controles ( $p=0.1$ )

El motivo principal por el cual los pacientes fueron incluidos al estudio fueron los siguientes: sepsis abdominal en 54/75 (72%), neutropenia febril 15/75 (20%), sepsis sin foco 5/75 (6.6%) e infección relacionada a CVC 1/75 (1.3%)

**Tabla 1. Características de pacientes con candidiasis invasiva y controles**

<b>Característica</b>	<b>Total N:75 (%)</b>	<b>Casos n: 24 (%)</b>	<b>Controles n: 51 (%)</b>	<b>p</b>
<b>Edad (media, DE)</b>	46(16.1)	45.4 (15.4)	46.3 (16.7)	0.8*
<b>Sexo femenino</b>	45 (60)	18 (75)	27 (52.9)	0.06
<b>Índice de Charlson (Mdn, RIC)</b>	3 (2-4)	3 (1.5-4)	2.5 (2-4.5)	0.8* <sup>1</sup>
<b>APACHE II (mdn, RIC)</b>	15 (10-19)	16 (11-21)	14 (10-19)	0.4* <sup>1</sup>
<b>Choque séptico</b>	36 (48.5)	12 (52)	24 (47)	0.6
<b>Cáncer</b>	50 (66.7)	34 (66.6)	16 (66.6)	1
<b>Sólido</b>	31 (43.6)	21 (43.7)	10 (43.4)	0.9
<b>Hematológico</b>	20 (26.6)	14 (27.4)	6 (25)	0.8
<b>Quimioterapia</b>	30 (40)	9 (37.5)	21 (41.1)	0.7

<b>Catéter central</b>	73 (97.3)	24 (100)	49 (96)	0.3
<b>Nutrición parenteral</b>	37 (49.3)	15 (62.5)	22(43.1)	0.1
<b>Esteroide</b>	25 (33.3)	5 (20.8)	20 (39.2)	0.1
<b>Ventilación mecánica</b>	38 (50.6)	11 (45.8)	27 (52.9)	0.5
<b>Terapia intensiva</b>	37 (49.3)	12 (50)	25 (49)	0.9
<b>Hemodiálisis</b>	8 (10.6)	3 (12.5)	5 (9.8)	0.7
<b>Pancreatitis</b>	6 (8)	3 (12.5)	3 (5.8)	0.3
<b>Cirrosis</b>	3 (4)	1 (4.1)	2 (3.9)	1
<b>Neutropenia</b>	22 (29.3)	8 (33.3)	14 (27.4)	0.6
<b>Inmunosupresores</b>	8 (10.6)	2 (8.3)	6 (11.7)	1
<b>Cirugía previa</b>	49 (65.3)	17 (70)	32 (62.7)	0.4
<b>Tratamiento antifúngico</b>	66 (88)	24 (100)	42 (82)	0.02
<b>Agente antifúngico inicial</b>				
Equinocandinas	44 (66)	19 (79)	25 (59)	
Fluconazol	16 (24)	3 (12.5)	13 (30.9)	
Voriconazol	5 (7.5)	2 (8.3)	3 (7.1)	
Combinado	1 (1.5)	1 (4.1)	0	
<b>Agente antifúngico definitivo</b>				
Equinocandinas	40 (60.6)	16 (66.6)	24 (57)	
Fluconazol	22 (33.3)	8 (33.3)	14 (33.3)	
Voriconazol	4 (6)	0	4 (9.5)	
<b>Duración del tratamiento (Mdn, RIC)</b>	11 (6-16)	14 (13-21)	7.5 (4-13)	0.0001
<b>Mortalidad a 30 días</b>	20 (26.6)	8 (33)	12 (23.5)	0.1

\*Prueba T student, \*<sup>1</sup> Prueba de Kruskal Wallis, \*<sup>2</sup> Exacta de Fisher

## 5.2 Clasificación de los pacientes incluidos en casos o controles

Durante el seguimiento, de los 75 pacientes que firmaron el consentimiento informado, 24 fueron considerados casos y 51 fueron considerados controles, de acuerdo con las definiciones establecidos. En la figura 1 se muestra el flujograma de los pacientes incluidos al estudio. Entre los 24 casos de candidiasis invasiva, 20.8% (5/24) fueron candidemias: 2 *C. parapsilosis*, 1 *C. albicans*, 1 *C. glabrata* y 1 *C. tropicalis*. Doce (50%) cumplieron criterios de candidiasis invasiva profunda: 5 peritonitis por *C. glabrata*, 2 peritonitis por *C. albicans*, 2 infecciones intratorácicas por *C. albicans* y 3 peritonitis con levaduras en la tinción de Gram directo del líquido estéril y cultivo negativo. El 29% (7/24) se clasificaron como candidiasis invasiva probable.

De los 24 pacientes con candidiasis invasiva, 13 presentaron alguna coinfección bacteriana, ver tabla 2. La causa de sepsis más frecuente en los pacientes sin candidiasis invasiva fue sepsis abdominal bacteriana en 26/51 (50.9%). El resto de las causas de la sepsis se resumen en la tabla 2.

**Figura 1. Flujograma de pacientes**

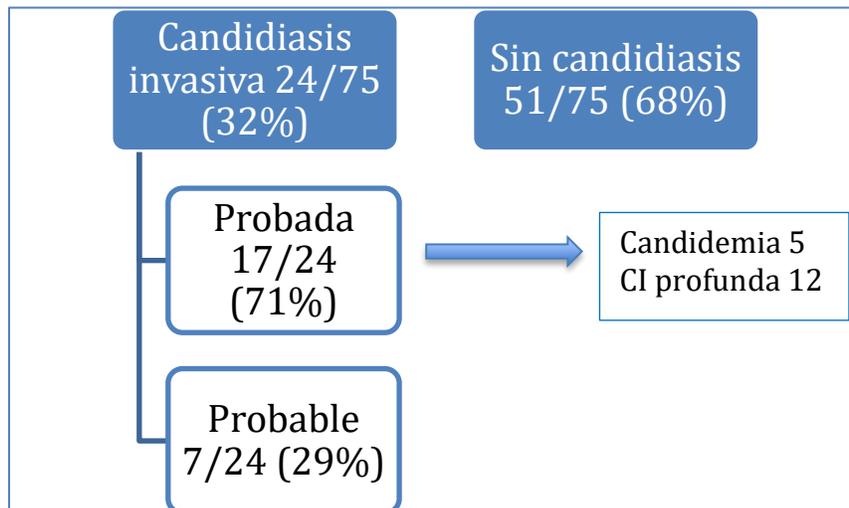


Tabla 2. Causas de sepsis en pacientes sin candidiasis invasiva

<b>Pacientes sin candidiasis invasiva</b>	<b>n:51 (%)</b>
Bacteremia	9 (17.6)
<i>E. coli</i>	4
<i>P. aeruginosa</i>	2
<i>Salmonella</i>	1
<i>S. haemolyticus</i>	1
<i>S. aureus</i>	1
Sepsis abdominal	26 (50.9)
Polibacteriana	18
Sin aislamiento	4
<i>E. faecalis</i>	1
<i>P. aeruginosa</i>	1
Colangitis por <i>Acinetobacter</i>	1
Colitis neutropénica	1
Neumonía	5 (9.8)
<i>P. aeruginosa</i>	1
<i>Enterobacter sp</i>	1
<i>P. aeruginosa</i> y <i>S. maltophilia</i>	1
<i>Fusarium*</i>	1
Sin aislamiento	1
Otros	11 (21.5)
Sepsis sin foco	2
<i>C. difficile</i>	1
Colitis por CMV / sepsis abdominal	1
Aspergilosis invasiva probable*	1
IVU por <i>E. coli</i> BLEE	1
Abscesos periodontales	1
Empiema por <i>P. aeruginosa</i> y	1
<i>Enterococcus spp.</i>	
Celulitis y absceso perianal	1
NAC y <i>C. difficile</i>	1
SRIS por HIPEC	1

CMV: Citomegalovirus. IVU: Infección de vías urinarias. BLEE: productora de betalactamasa de espectro extendido. NAC: Neumonía adquirida en la comunidad. SRIS: Síndrome de respuesta inflamatoria. HIPEC: Quimioterapia intraperitoneal hipertérmica.

### 5.3 Rendimiento diagnóstico de los ensayos de PCR

**PCR múltiple IPICYT :** En la primera fase del estudio (de enero a mayo de 2017) se enviaron las muestras recolectadas (después de realizar extracción de DNA en el INCMNSZ), al IPICYT. Dentro de esas muestras se incluyeron 9 casos de candidiasis invasiva (6 probados y 3 probables). Los casos considerados candidiasis probada se trataban de 1 candidemia, 3 peritonitis y 2 cultivos de líquido

pleural con *Candida*. Todos los ensayos de PCR múltiple resultaron negativos. Por este motivo terminamos esta fase y se suspendió el envío de muestras al IPICYT.

**PCR UNAM:** En diciembre de 2017 se decidió realizar un análisis intermedio para evaluar el rendimiento diagnóstico de esta PCR múltiple, y se enviaron las muestras a la facultad de Medicina de la UNAM (después de extracción de ADN) para correr los ensayos de PCR múltiple, incluyendo muestras de los pacientes incluidos durante la primera fase. Nuevamente, todos los resultados (incluidos los 24 casos de candidiasis invasiva) fueron negativos.

**PCR Punto final INCMNSZ:** Analizando los resultados de las muestras tomadas al momento de la inclusión, se encontró una sensibilidad de 4% y 25% para la región ITS y NL, respectivamente. Así como una especificidad de 80% y 60% para ITS y NL, respectivamente. (Tablas 3-6) Agrupando los resultados para considerar como positivo un resultado de ITS o NL en conjunto, los valores de sensibilidad son iguales a los de NL solo, ya que el único caso positivo de ITS está contenido en los 5 casos de NL positivo.

Posteriormente, se evaluó el comportamiento de los PCR, al analizar cualquier resultado positivo de ITS o NL en cualquier momento del seguimiento (día cero, 3, 7 o 14) y se encontró una sensibilidad de 50% y especificidad de 47% (Tablas 7-8)

**Tabla 3. PCR (ITS) en el día de la inclusión (Día 0)**

	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	
<b>ITS +</b>	1	10	11
<b>ITS -</b>	23	41	64
	24	51	75

**Tabla 4. Rendimiento diagnóstico de PCR (ITS) al día cero**

	<b>Valor (IC95%)</b>
<b>Sensibilidad</b>	4.1 (0.1-21.1)
<b>Especificidad</b>	80.4 (66.8-90.1)
<b>Valor predictivo negativo</b>	64 (60.3-67.6)
<b>Valor predictivo positivo</b>	9 (1.34-42.4)

**Tabla 5. PCR (NL) en el día de la inclusión (Día 0)**

	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	
<b>NL +</b>	5	16	21
<b>NL -</b>	19	35	55
	24	51	75

**Tabla 6. Rendimiento diagnóstico de PCR (NL) en el día de la inclusión**

<b>PCR NL día cero</b>	<b>Valor (IC95%)</b>
<b>Sensibilidad</b>	25 (8.6-49.1)
<b>Especificidad</b>	60.7 (46.1-74.1)
<b>Valor predictivo negativo</b>	67.4 (59.6-74.3)
<b>Valor predictivo positivo</b>	20 (9.8-36.5)

**Tabla 7. PCR ITS/NL positivo durante el seguimiento**

<b>Cualquier ITS/NL</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	
<b>PCR +</b>	12	27	39
<b>PCR -</b>	12	24	37
	24	51	75

**Tabla 8. Rendimiento diagnóstico PCR ITS/NL durante el seguimiento.**

<b>Cualquier PCR NL/ ITS (+)</b>	<b>Valor (IC95%)</b>
<b>Sensibilidad</b>	50 (29.1-70.8)
<b>Especificidad</b>	47 (32.9-61.5)
<b>Valor predictivo negativo</b>	66.6 (54.9-76.6)

Valor predictivo positivo	30.7 (21.6-41.7)
---------------------------	------------------

#### 5.4 Análisis del subgrupo de candidiasis invasiva probada (cultivo positivo)

Cuando analizamos el subgrupo de pacientes con cultivos positivos, encontramos una sensibilidad y especificidad de 0 y 47% para ITS, respectivamente y una sensibilidad y especificidad de 12.5 y 47% para NL, respectivamente. (Tablas 9-12)

**Tabla 9. ITS al día cero en subgrupo con cultivo +**

ITS (0)	Casos	Controles	
ITS +	0	27	27
ITS -	16	24	40
	16	51	67

**Tabla 10. Rendimiento diagnóstico de ITS al día 0, con cultivo +**

ITS (+)	Valor (IC95%)
Sensibilidad	0 (0-20.5)
Especificidad	47 (32.9-61.5)
Valor predictivo negativo	60 (55-66.7)
Valor predictivo positivo	0

**Tabla 11. NL al día cero, en subgrupo con cultivo +**

NL (0)	Casos	Controles	
NL +	2	27	29
NL -	14	24	38
	16	51	67

**Tabla 12. Rendimiento diagnóstico de NL al día 0, con cultivo +**

NL (+) Candidiasis probada	Valor (IC95%)
Sensibilidad	12.5 (1.55-38.3)
Especificidad	47 (32.9-61.5)
Valor predictivo negativo	63.1 (54.8-70.7)
Valor predictivo positivo	6.9 (1.94-21.7)

### Comportamiento de PCR por grupos.

En la tabla 15 se muestra la distribución de los casos de candidiasis invasiva probada en relación con el resultado del PCR (ITS o NL en cualquier momento del seguimiento), encontramos que 1/5 (20%) candidemias, 6/12 (50%) candidiasis invasivas profundas y 4/8 (50%) candidiasis invasivas probables, tuvieron resultados de PCR positivos. El paciente con candidemia y PCR positivo, tuvo resultados positivos en las muestras de los días 3 y 7.

El caso de aspergilosis invasiva probable tuvo PCR ITS (+) al día +3. El caso de neumonía por *Fusarium* tuvo PCR NL + al momento de la inclusión

**Tabla 15. Resultado de PCR por grupo**

	Candidemia	CI profunda	CI probable	Controles
PCR +	1	6	4	27
PCR -	4	6	4	24
	5	12	8	51

### 5.5 Análisis de factores relacionados una baja sensibilidad de PCR.

Al obtener los resultados del rendimiento diagnóstico de la prueba, intentamos identificar causas por las cuáles encontramos una baja sensibilidad. El primer factor que estudiamos fue el momento de la toma de sangre periférica, por el impacto conocido del inicio de tratamiento antifúngico sobre la sensibilidad del PCR.

Observamos que en 49.3% (37/75) de los pacientes, la primera muestra de sangre fue tomada más de 24 horas después del inicio de antifúngico. Esto ocurrió en el 45.8% (11/24) de los casos de candidiasis invasiva y en 50.9% (26/51) de los controles ( $p = 0.6$ ) (Tabla 16)

Analizando los casos de candidiasis invasiva con PCR positiva en cualquier momento del seguimiento, observamos que la primera muestra de sangre se tomó después de 24 horas en 27%(3/11), mientras que en los casos con PCR negativa esto ocurrió en 61% (8/13) ( $p=0.1$ ) Aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística, se observa una tendencia a mayor cantidad de PCR negativos en los

casos cuando la muestra se toma >24 horas después del inicio de antifungicos. (Tabla 16)

Cuando analizamos los resultados de la muestra tomada al día 0, observamos que en el 100% los casos con PCR positiva, la toma de sangre periférica ocurrió en menos 24 horas del inicio de tratamiento antifúngico, mientras que en 57.8% (11/19) los casos con PCR negativa al día cero, la toma de sangre ocurrió después de 24 horas, con una diferencia estadísticamente significativa mediante la prueba de Fisher (p= 0.041) (Tabla 17)

Estos resultados confirman que la duración del tratamiento antifúngico al momento de la toma de la muestra tuvo un impacto sobre la sensibilidad de la prueba. La principal razón por la que esto ocurrió fue el retraso del paciente o familiar para otorgar consentimiento informado.

En segundo lugar, dado que las candidiasis invasivas que tienen origen en la translocación de levaduras en el tracto digestivo, tienen una menor carga de levaduras en sangre en comparación con los casos de origen intravascular, analizamos si este factor pudiera tener relación con el resultado de la PCR al día 0. Encontramos un origen intravascular de la candidiasis invasiva en 20% (1/5) de los casos con PCR positiva al día cero y 26% (5/19) en los casos con PCR negativa (p=1). (Tabla 17 y 18) No se encontró una relación con este factor, sin embargo son pocos los casos con un origen intravascular.

**Tabla 16. Momento de la toma de la muestra y resultado del PCR durante el seguimiento**

<b>Momento de la toma</b>	<b>Todos n: 75</b>	<b>Casos n: 24 (%)</b>	<b>Casos PCR (+) n:11</b>	<b>Casos PCR (-) n:13</b>
< 24 horas después	38 (50.6)	13 (54.1)	8 (72)	5 (38)
<b>&gt; 24 horas después</b>	<b>37 (49.3)</b>	<b>11 (45.8)</b>	<b>3 (27)</b>	<b>8 (61)</b>

Exacta de Fsiher p= 0.1

**Tabla 17. Momento de la toma de la muestra y resultado del PCR, al día 0**

Momento de la toma	Casos n: 24 (%)	Casos PCR (+) n:5 (%)	Casos PCR (-) n:19 (%)
< 24 horas de AF	13 (54.1)	5 (100)	8 (42.1)
<b>&gt; 24 horas de AF</b>	<b>11 (45.8)</b>	<b>0</b>	<b>11 (57.8)</b>

AF: Tratamiento antifungico. Exacta de Fisher p=0.041

**Tabla 17. Origen de la candidiasis invasiva y resultado de PCR al día 0**

Origen intravascular	PCR (+) n: 21	(PCR -) n: 54	
<b>No</b>	11 (53.4)	39 (72.2)	50
<b>Si</b>	10 (47.6)	15 (27.7)	25
	21	54	75

p: 0.1 Chi cuadrada

**Tabla 18. Origen de la candidiasis invasiva y resultado de PCR al día 0, en los casos**

Origen intravascular	PCR (+) n: 5	(PCR -) n: 14	
<b>No</b>	4 (80)	14 (73.6)	18
<b>Si</b>	1 (20)	5 (26.3)	6
	5	19	24

p= 1 Exacta de Fisher

**5.6 PCR persistentemente positivo.** Se encontraron 10 pacientes con 3 ó más resultados de PCR (ITS o NL) positivos durante el seguimiento, que se distribuyeron de la siguiente manera:

- 8 controles, de los cuáles 1/8 falleció en los siguientes 30 días.
- 2 casos de candidiasis invasiva:
  - 1 caso de candidiasis invasiva probable que falleció durante el seguimiento
  - 1 caso de candidiasis profunda que se encontraba vivo al final del seguimiento.

No parece existir una relación entre la persistencia de la positividad y la mortalidad, sin embargo son pocos casos.

## 6. Discusión

En este estudio intentamos validar de manera prospectiva, 3 ensayos de PCR para el diagnóstico de candidiasis invasiva. Los ensayos de PCR múltiple no tuvieron capacidad de amplificar DNA de *Candida* de las muestras de sangre periférica de pacientes con sospecha de candidiasis invasiva. Se obtuvieron resultados negativos para todas las pruebas realizadas incluso en los pacientes con hemocultivo o cultivo de sitios estériles con crecimiento de *Candida*. Por otro lado, el ensayo de PCR punto final mostró una sensibilidad y valor predictivo positivos muy bajos (25% y 20% respectivamente) así como una especificidad y valor predictivo negativos bajos, 60 y 67%, respectivamente. Lo anterior se traduce en una prueba poco útil para la práctica clínica. Por tal motivo, a pesar de no haber reunido el número de pacientes definido en el cálculo del tamaño de la muestra, decidimos detener el estudio después del análisis intermedio y concluir que los ensayos de PCR no tuvieron una sensibilidad y especificidad > 90%, como era nuestra hipótesis inicial.

Al comparar los resultados entre las regiones utilizadas (ITS y NL) encontramos una mejor sensibilidad de NL (región D1-D2) en comparación con la región ITS. Este último tuvo una sensibilidad y especificidad de 4 y 80% respectivamente. Incluso en el subgrupo de pacientes con cultivos positivos, observamos la misma tendencia a sensibilidad y especificidad bajas (12.5 y 47% respectivamente). La región ITS se localiza entre la subunidad 18S y 28 S tiene un tamaño de 500 pares de bases en los ascomicetos como *Candida* y la evaluamos mediante los primers ITS-4F y ITS-5R, la región D1/D2 contiene 600 pares de base y se encuentra cerca de la subunidad grande del 26S. La amplificación de ambas regiones ha mostrado ser útil para la identificación de especies de *Candida*, debido a su variabilidad, sin embargo no se ha comparado la sensibilidad entre ellos.(33, 34)

Posteriormente evaluamos el rendimiento diagnóstico en el transcurso del seguimiento (tomando en cuenta cualquier PCR positivo en los días 0, 3, 7 y 14) y encontramos una sensibilidad de especificidad de 50 y 47%, sin embargo, dado que la principal utilidad de esta prueba es la identificación de los casos de manera temprana, tampoco parece tener utilidad en el diagnóstico de manera práctica.

Existen múltiples estudios en la literatura que reportan valores de sensibilidad y especificidad elevados con la técnica de PCR para el diagnóstico de candidiasis invasiva. Un meta análisis en el 2011 mostró una sensibilidad y especificidad promedio de 95 y 92%, con estudios posteriores que lo corroboran.(24-27, 35) Nuestros resultados contrastan drásticamente con los estudios mencionados. Consideramos que existen múltiples razones que pueden explicar nuestros resultados. En primer lugar, se ha reportado que las PCR tienen una sensibilidad analítica de entre 5 y 20 UFC/ ml, en comparación con 1 UFC/ ml para el hemocultivo. En estudios *in vitro*, inoculando cantidades conocidas de *Candida* en hemocultivos, se encontró que cuando existe una carga de levaduras circulantes menor a 1 UFC/ ml los ensayos de PCR logran amplificar DNA de *Candida* en el 25% de los casos, mientras que cuando la carga es de 10 UFC/ml, los PCR logran amplificar DNA en el 83% de los casos. Por lo anterior, en teoría los PCR tienen una sensibilidad analítica menor en comparación con el hemocultivo. La principal razón para ello, es la dificultad para lograr la ruptura de la pared de las levaduras para acceder y amplificar el DNA fúngico.(12, 36, 37)

En segundo lugar, no todas las candidemias tienen la misma carga de levaduras circulantes. Se sabe que las candidemias cuyo origen es la translocación en el tracto gastrointestinal, tienen una menor carga en comparación con aquellas cuyo origen es intravascular (como ocurre en pacientes neutropénicos e infecciones relacionadas a catéter). En candidemias de origen gastrointestinal se encuentran 2.5 UFC/ ml en comparación con <1 UFC/ ml en las intravasculares, debido a la filtración eficiente de las levaduras a nivel hepático. En nuestro estudio, en el 75% de los casos, se consideró que el origen de la candidemia fue translocación

gastrointestinal debido al antecedente de sepsis abdominal en todos ellos.(33, 34) Por lo anterior, se sospecha que los casos incluidos en este estudio, tendrían una carga baja de levaduras en la sangre, dificultando aún más la amplificación de DNA.

En cuanto a la diferencia en la sensibilidad de la PCR punto final en comparación con las PCR múltiples, hay que mencionar que antes del inicio del reclutamiento de pacientes, realizamos un ensayo de validación *in vitro*, probando la detección de DNA con botellas de hemocultivo inoculadas con concentraciones conocidas de levaduras, y se estableció que el umbral de detección podía ser tan bajo como 4 UFC/ml. (Comunicación personal: Dra Areli Martínez Gamboa, datos no publicados) Para los ensayos de PCR múltiple, lo reportado por sus fabricantes fue un umbral de detección de 20 UFC/ml (reporte verbal), lo que explicaría que la PCR punto final tuviera mayor capacidad de amplificar el DNA.

Por otro lado, un factor conocido que disminuye la sensibilidad del PCR es el antecedente de haber recibido tratamiento antifúngico. En los criterios de selección especificamos que podríamos incluir pacientes que hubieran recibido tratamiento antifungico con una duración menor a 72 horas, por la dificultad de encontrar pacientes y que estos otorgaran el consentimiento informado en ese plazo. Al analizar esta variable, encontramos una diferencia significativa en cuanto al momento de la toma de sangre periférica, siendo que en el 100% de los casos con PCR positiva, esta se tomó antes de 24 horas del inicio de antifúngicos, mientras que en el 58% de los casos con PCR negativa, se tomó después de 24 horas. Esto es una limitación importante del estudio, sin embargo deriva de la dificultad inherente de realizar validación de pruebas diagnósticas de manera prospectiva. En los estudios donde se utilizan muestras almacenadas en bancos de sangre, no existe esta limitación, pero no es posible seleccionar el espectro adecuado de pacientes con sospecha clínica de la condición.(38)

Finalmente, al respecto del meta-análisis de Avni, es necesario resaltar dos aspectos. En primer lugar, la sensibilidad y especificidad promedio que reportan

proviene de la combinación de 101 metodologías de PCR diferentes, haciendo que los estudios entre si no sean completamente comparables.(24) Además, en 15 de los 54 estudios incluidos, se utilizaron voluntarios sanos como controles, lo cual es conocido que puede incrementar falsamente la sensibilidad de una prueba.(39) Nuestro diseño de buscar casos y controles de una misma población con sospecha de la enfermedad reclutada de manera prospectiva, representa una mayor dificultad, pero al mismo tiempo brinda resultados más cercanos a la realidad.

Además, en los estudios contenidos en el meta-análisis no se estudiaron las regiones ITS o NL que utilizamos para el estudio, por lo que la sensibilidad reportada no necesariamente aplica para estos blancos moleculares. Finalmente, dado que en este meta-análisis no se reportó el sesgo de publicación, se desconoce el impacto que pudieran tener los estudios negativos, como el nuestro, y nos permite especular que en la práctica, la sensibilidad y especificidad de esta técnica sea en realidad menor. Esto resalta la importancia de publicar los ensayos con resultados negativos y de incluir esta evaluación al realizar meta-análisis.(24)

En cuanto a la baja especificidad de la prueba, con la intención de reducir los falsos positivos se utilizó un control de amplificación negativo para identificar los casos en que ocurriera contaminación de la PCR durante su montaje. Sin embargo, no es posible garantizar esto para el paso de la extracción de DNA, ya que en ese momento no se realizan controles negativos. Además, los blancos moleculares utilizados son panfúngicos, lo que quiere decir que la presencia de otras infecciones fúngicas pueden dar resultados positivos, como fue el caso de los pacientes que presentaron neumonía por *Fusarium* y aspergilosis invasiva y tuvieron PCR positiva.(40)

En cuanto a los últimos dos objetivos, no encontramos una relación entre la persistencia de la positividad de la PCR y la mortalidad. Solamente se presentaron 2 casos de candidiasis con PCR persistentemente positiva, de los cuáles hubo una defunción y un sobreviviente a 30 días.

Una de las fortalezas del estudio es el diseño de casos y controles prospectivo en pacientes con sospecha de candidiasis invasiva, que si bien, incrementa la dificultad de ejecutar el estudio, representa una metodología estricta para obtener los resultados más cercanos a la realidad de los pacientes en quienes se busca implementar la prueba. Además, utilizamos reglas de predicción validadas (Ostrosky2 y NMC) para la identificación de pacientes con sospecha de candidiasis invasiva, con el objetivo de utilizar una metodología comparable a la manera de seleccionar casos en ensayos clínicos aleatorios. Nos basamos en las dos reglas que tienen la mayor sensibilidad y que fueron validadas en poblaciones similares a las nuestras. Con ello logramos incrementar la prevalencia de una enfermedad poco frecuente, que se presenta en los pacientes críticos con una prevalencia general de 3% a un 32%. Además, encontramos que la regla de predicción que mejor se ajusta a nuestra población es la propuesta por el grupo de Nebraska Medical Center, lo cual será de utilidad para futuros estudios.(12)

Finalmente, consideramos que hasta el momento no se ha logrado identificar la prueba ideal para el diagnóstico de candidiasis invasiva. El estándar de referencia tiene una sensibilidad de 50% al comparar con autopsias, sin embargo las alternativas utilizadas hasta el momento no han logrado mostrar ser el marcador ideal. El uso de B-d glucano está limitado por el costo, la elevada cantidad de falsos positivos y el poco impacto que ha tenido para disminuir la mortalidad en pacientes que reciben tratamiento anticipado guiado por este marcador.(12, 15)

El ensayo de T2MR *Candida* que se basa en un kit de resonancia magnética que detecta cambios de señales específicos de las 5 especies más comunes de *Candida* de manera simultánea, tampoco ha mejorado la sensibilidad del hemocultivo y tiene un costo muy elevado.(41) Finalmente, las PCR no se encuentran estandarizados, suelen tener un costo elevado y tienen una sensibilidad analítica muy baja, por lo cual su uso en la práctica clínica no necesariamente refleja los resultados de los estudios publicados bajo condiciones favorables.(40, 42)

Es necesario continuar en la búsqueda de nuevos biomarcadores y realizar su validación con ensayos de pruebas diagnósticas con metodologías rigurosas, antes de implementarlos en la práctica clínica.

## **7 Conclusión**

En este estudio el rendimiento diagnóstico de 2 ensayos de PCR múltiple y 1 ensayo de PCR punto final fue inferior al hemocultivo para detectar a pacientes con candidiasis invasiva de manera prospectiva. Los ensayos de PCR múltiple no tuvieron la capacidad de amplificar ADN de *Candida* en pacientes con cultivo positivo. Es probable que la baja sensibilidad se deba a la baja sensibilidad analítica de la prueba y al tipo de pacientes, en su mayoría con candidiasis de origen extravascular y al antecedente de haber recibido tratamiento antifúngico > 24 horas previo a la toma de la muestra.

## 8. Referencias

1. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996;9(4):499-511. doi: 10.1128/cmr.9.4.499.
2. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39(3):309-17. Epub 2004/08/13. doi: 10.1086/421946. PubMed PMID: 15306996.
3. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. 2015;373(15):1445-56. Epub 2015/10/09. doi: 10.1056/NEJMra1315399. PubMed PMID: 26444731.
4. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2816-23. Epub 2006/08/08. doi: 10.1128/JCM.00773-06. PubMed PMID: 16891497; PubMed Central PMCID: PMC1594610.
5. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373. Epub 2013/03/26. doi: 10.1371/journal.pone.0059373. PubMed PMID: 23527176; PubMed Central PMCID: PMC3601956.
6. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133-63. Epub 2007/01/16. doi: 10.1128/CMR.00029-06. PubMed PMID: 17223626; PubMed Central PMCID: PMC1797637.
7. González-Lara MF, Torres-González P, Leon-Garduño APD, Cornejo-Juarez P, Corzo-Leon DE, Sifuentes-Osornio J. Epidemiology and Outcome of Non-albicans Candida Bloodstream Infections (NAC-BSI) in a Network of Tertiary Care Hospitals in Mexico City: A 6-Year Laboratory-Based Surveillance. *Open Forum Infectious Diseases*. 2015;2(suppl\_1). doi: 10.1093/ofid/ofv133.89.
8. Corzo-Leon DE, Alvarado-Matute T, Colombo AL, Cornejo-Juarez P, Cortes J, Echevarria JI, et al. Surveillance of Candida spp bloodstream infections:

epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals. *PLoS One*. 2014;9(5):e97325. Epub 2014/05/17. doi: 10.1371/journal.pone.0097325. PubMed PMID: 24830654; PubMed Central PMCID: PMC4022628.

9. Ostrosky-Zeichner L. Clinical prediction rules for invasive candidiasis in the ICU: ready for prime time? *Crit Care*. 2011;15(5):189. Epub 2011/09/29. doi: 10.1186/cc10422. PubMed PMID: 21943066; PubMed Central PMCID: PMC3334741.

10. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009;302(21):2323-9. Epub 2009/12/03. doi: 10.1001/jama.2009.1754. PubMed PMID: 19952319.

11. Eggimann P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care*. 2011;1:37. Epub 2011/09/13. doi: 10.1186/2110-5820-1-37. PubMed PMID: 21906271; PubMed Central PMCID: PMC3224461.

12. Hermsen ED, Zapapas MK, Maiefski M, Rupp ME, Freifeld AG, Kalil AC. Validation and comparison of clinical prediction rules for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a matched case-control study. *Crit Care*. 2011;15(4):R198. Epub 2011/08/19. doi: 10.1186/cc10366. PubMed PMID: 21846332; PubMed Central PMCID: PMC3387640.

13. Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, Alexander BD, Donowitz G, Kan V, et al. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26(4):271-6. Epub 2007/03/03. doi: 10.1007/s10096-007-0270-z. PubMed PMID: 17333081.

14. Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG, Shoham S, Reboli A, Barron MA, Sims C, et al. Improvement of a clinical prediction rule for clinical trials on prophylaxis for invasive candidiasis in the intensive care unit. *Mycoses*. 2011;54(1):46-51. Epub 2009/07/25. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01756.x. PubMed PMID: 19627509.

15. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and

transform patient care. *Clin Infect Dis*. 2013;56(9):1284-92. Epub 2013/01/15. doi: 10.1093/cid/cit006. PubMed PMID: 23315320.

16. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813-21. Epub 2008/05/09. doi: 10.1086/588660. PubMed PMID: 18462102; PubMed Central PMCID: PMC2671227.

17. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2011;52(6):750-70. Epub 2011/03/04. doi: 10.1093/cid/ciq206. PubMed PMID: 21367728.

18. Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ, Bow EJ, Hadley S, Leon C, Nucci M, et al. Early treatment of candidemia in adults: a review. *Med Mycol*. 2011;49(2):113-20. Epub 2010/09/08. doi: 10.3109/13693786.2010.512300. PubMed PMID: 20818922.

19. Schuster MG. Empirical Fluconazole versus Placebo for Intensive Care Unit Patients. *Annals of Internal Medicine*. 2008;149(2). doi: 10.7326/0003-4819-149-2-200807150-00004.

20. Timsit JF, Azoulay E, Schwebel C, Charles PE, Cornet M, Souweine B, et al. Empirical Micafungin Treatment and Survival Without Invasive Fungal Infection in Adults With ICU-Acquired Sepsis, Candida Colonization, and Multiple Organ Failure: The EMPIRICUS Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016;316(15):1555-64. Epub 2016/10/19. doi: 10.1001/jama.2016.14655. PubMed PMID: 27706483.

21. Bruyere R, Quenot JP, Prin S, Dalle F, Vigneron C, Aho S, et al. Empirical antifungal therapy with an echinocandin in critically-ill patients: prospective evaluation of a pragmatic Candida score-based strategy in one medical ICU. *BMC Infect Dis*. 2014;14:385. Epub 2014/07/13. doi: 10.1186/1471-2334-14-385. PubMed PMID: 25015848; PubMed Central PMCID: PMC4227296.

22. Zilberberg MD, Kothari S, Shorr AF. Cost-effectiveness of micafungin as an alternative to fluconazole empiric treatment of suspected ICU-acquired candidemia

among patients with sepsis: a model simulation. *Crit Care*. 2009;13(3):R94. Epub 2009/06/24. doi: 10.1186/cc7924. PubMed PMID: 19545361; PubMed Central PMCID: PMC2717466.

23. Ostrosky-Zeichner L, Shoham S, Vazquez J, Reboli A, Betts R, Barron MA, et al. MSG-01: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of caspofungin prophylaxis followed by preemptive therapy for invasive candidiasis in high-risk adults in the critical care setting. *Clin Infect Dis*. 2014;58(9):1219-26. Epub 2014/02/20. doi: 10.1093/cid/ciu074. PubMed PMID: 24550378.

24. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):665-70. Epub 2010/11/26. doi: 10.1128/JCM.01602-10. PubMed PMID: 21106797; PubMed Central PMCID: PMC3043518.

25. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: Comparison with Culture, Antigen Detection, and Biochemical Methods for Species Identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(7):2483-9. doi: 10.1128/jcm.40.7.2483-2489.2002.

26. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, et al. Performance of Candida real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012;54(9):1240-8. Epub 2012/03/21. doi: 10.1093/cid/cis200. PubMed PMID: 22431804.

27. Fortun J, Meije Y, Buitrago MJ, Gago S, Bernal-Martinez L, Peman J, et al. Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(11):3134-41. doi: 10.1093/jac/dku225.

28. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013;41(2):580-637. Epub 2013/01/29. doi: 10.1097/CCM.0b013e31827e83af. PubMed PMID: 23353941.

29. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galvan B, Blanco A, Castro C, et al. Usefulness of the "Candida score" for discriminating between Candida colonization

and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med.* 2009;37(5):1624-33. Epub 2009/03/28. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819daa14. PubMed PMID: 19325481.

30. Hajian-Tilaki K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *J Biomed Inform.* 2014;48:193-204. Epub 2014/03/04. doi: 10.1016/j.jbi.2014.02.013. PubMed PMID: 24582925.

31. Pitter D, Monod M, Sutter PM, E F. Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 1994;229(6):751-8.

32. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012(62). Epub 2012/05/02. doi: 10.3791/3923. PubMed PMID: 22546956; PubMed Central PMCID: PMC4846332.

33. Leaw SN, Chang HC, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important Candida and non-Candida yeast species by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol.* 2007;45(7):2220-9. Epub 2007/05/18. doi: 10.1128/JCM.00543-07. PubMed PMID: 17507521; PubMed Central PMCID: PMC1933000.

34. Ramos JP, Rosa CA, Carvalho EM, Leoncini O, Valente P. Heteroduplex mobility assay of the 26S rDNA D1/D2 region for differentiation of clinically relevant Candida species. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2006;89(1):39-44. Epub 2005/12/06. doi: 10.1007/s10482-005-9007-0. PubMed PMID: 16328861.

35. Zhang J, Hung GC, Nagamine K, Li B, Tsai S, Lo SC. Development of Candida-Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important Candida Species. *Microbiol Insights.* 2016;9:21-8. Epub 2016/04/23. doi: 10.4137/MBI.S38517. PubMed PMID: 27103821; PubMed Central PMCID: PMC4836890.

36. Pfeiffer CD, Samsa GP, Schell WA, Reller LB, Perfect JR, Alexander BD. Quantitation of Candida CFU in initial positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8):2879-83. Epub 2011/06/17. doi: 10.1128/JCM.00609-11. PubMed PMID: 21677065; PubMed Central PMCID: PMC3147732.

37. Telenti A, Steckelberg JM, Stockman L, Edson RS, Roberts GD. Quantitative Blood Cultures in Candidemia. *Mayo Clinic Proceedings*. 1991;66(11):1120-3. doi: 10.1016/s0025-6196(12)65791-7.
38. Nucci M. Persistent Candidemia: Causes and Investigations. *Current Fungal Infection Reports*. 2010;5(1):3-11. doi: 10.1007/s12281-010-0039-1.
39. Schmidt RL, Factor RE. Understanding sources of bias in diagnostic accuracy studies. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(4):558-65. Epub 2013/04/03. doi: 10.5858/arpa.2012-0198-RA. PubMed PMID: 23544945.
40. Alanio A, Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 6:36-41. Epub 2014/03/26. doi: 10.1111/1469-0691.12617. PubMed PMID: 24661790.
41. Clancy CJ, Pappas PG, Vazquez J, Judson MA, Kontoyiannis DP, Thompson GR, 3rd, et al. Detecting Infections Rapidly and Easily for Candidemia Trial, Part 2 (DIRECT2): A Prospective, Multicenter Study of the T2Candida Panel. *Clin Infect Dis*. 2018;66(11):1678-86. Epub 2018/02/14. doi: 10.1093/cid/cix1095. PubMed PMID: 29438475.
42. Clancy CJ, Nguyen MH. Non-Culture Diagnostics for Invasive Candidiasis: Promise and Unintended Consequences. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(1). Epub 2018/02/22. doi: 10.3390/jof4010027. PubMed PMID: 29463043; PubMed Central PMCID: PMC5872330.

## **Agradecimientos**

Agradezco a los tutores del trabajo por su interés, dedicación y apoyo para realizar, evaluar y analizar este trabajo de manera rigurosa.

Agradezco al Dr. Sifuentes, Ponce de León y Torres a quienes considero mis maestros mas cercanos y mentores como Infectóloga e investigadora.

Agradezco a la Dra. Areli Martínez por el desarrollo de las técnicas moleculares para este trabajo, así como la paciencia para su explicación y su arduo trabajo diario en el laboratorio, el cual ha sido un complemento fundamental en diversos proyectos de investigación.

Agradezco a la Dra. Cornejo y Vilar quienes sembraron la semilla de interés en la Infectología como tutoras de servicio social, así como el apoyo de la Dra. Cornejo para realizar este trabajo de maestría.

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional para desarrollarme como persona, médico e investigadora.