



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS.**

**VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN CLÍNICA DE UN  
ENSAYO DE AMPLIFICACIÓN VISUAL  
ISOTÉRMICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA  
UNA DETECCIÓN RÁPIDA DE ASPERGILLUS  
SPP Y MECANISMOS DE RESISTENCIA A  
ANTIFÚNGICOS**

## **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO  
ESPECIALISTA EN:  
INFECTOLOGÍA**

**PRESENTA:  
JAIME ISRAEL GARCIA MINAMY**

**TUTOR DE TESIS:  
DR. EDUARDO BECERRIL VARGAS**



**CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2023**



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.

## ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	6
OBJETIVOS.....	7
JUSTIFICACION.....	8
HIPOTESIS.....	9
METODOLOGIA.....	10
DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES.....	19
UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA.....	20
CALCULO DE LA MUESTRA.....	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

## **INTRODUCCION.**

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) son un grupo de enfermedades que han aumentado progresivamente en las últimas dos décadas, principalmente en el ámbito nosocomial. Se estima que más de 1,6 millones de personas mueren cada año a causa de enfermedades fúngicas y alrededor de mil millones de personas sufren infecciones fúngicas<sup>1,2</sup>. El diagnóstico de enfermedades fúngicas requiere un alto nivel de sospecha clínica y atención especializada, pruebas de laboratorio, así como experiencia en cultivo, histopatología e imagenología. *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jirovecii* y *Mucormycosis* son los agentes más comúnmente asociados con micosis oportunistas; patógenos que comúnmente invaden las vías respiratorias, digestivas o los dispositivos intravasculares<sup>3,4,5</sup>. La aspergilosis, definida como una infección causada por organismos incluidos en el género *Aspergillus*; constituye un espectro de enfermedades que van desde reacciones alérgicas hasta enfermedades diseminadas en huéspedes inmunocomprometidos. *Aspergillus fumigatus* es el organismo predominante que causa la aspergilosis invasiva (IA), pero otras especies se han vuelto cada vez más reconocidas como patógenos oportunistas importantes. *Aspergillus* es una de las causas más frecuentes de infecciones fúngicas y con una elevada mortalidad, siendo las dificultades y retrasos para realizar un diagnóstico microbiológico uno de los factores relacionados con su mal pronóstico<sup>6</sup>. El diagnóstico de las IFI sigue siendo un reto difícil, sobre todo por la baja especificidad de las manifestaciones clínicas, la ausencia de hallazgos radiológicos que sean patognomónicos y la baja sensibilidad y relativa lentitud de los métodos microbiológicos. Las limitaciones inherentes y la baja sensibilidad de los métodos tradicionales de diagnóstico microbiológico como la observación microscópica de muestras clínicas, su cultivo en medios artificiales y la posterior identificación de hongos aislados en dichos medios por diversas técnicas, implican un diagnóstico tardío que posterga el establecimiento del tratamiento antifúngico más adecuado y favorece la aparición de daños orgánicos irreversibles<sup>7,8</sup>. Históricamente, el diagnóstico se ha basado en el aislamiento de *Aspergillus* en cultivo combinado con características histopatológicas o radiográficas compatibles de la enfermedad. Sin embargo, el cultivo de hongos es relativamente lento e insensible, mientras que la histopatología y las imágenes radiográficas no son específicas para el organismo.

El uso de biomarcadores de la pared celular fúngica, como el 1,3-D-glucano o el antígeno de galactomanano de *Aspergillus*, ha mejorado el diagnóstico temprano de la AI, pero estos métodos también tienen limitaciones significativas, incluida la baja sensibilidad en ciertos grupos de pacientes y problemas de falta de especificidad<sup>9</sup>. Debido al bajo rendimiento de las pruebas de diagnóstico, la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer/Grupo Cooperativo de Infecciones Fúngicas Invasivas y el Grupo de Estudio de Micosis del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (EORTC/MSG) diseñaron definiciones compuestas, que establecieron un marco formal para definir la infección fúngica invasiva con certeza diagnóstica variable. Las definiciones asignan 3 niveles de probabilidad al diagnóstico de IFI “comprobada”, “probable” y “posible”, los cuales son ampliamente utilizados para la identificación de casos y permiten iniciar el tratamiento empírico de manera oportuna<sup>10</sup>. Recientemente ha habido un interés significativo en el uso de diagnósticos moleculares para ayudar en el diagnóstico rápido y preciso de la aspergilosis. El diagnóstico basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la detección rápida y sensible de una mayor variedad de muestras y agentes infecciosos. Aunque la PCR es considerada como el estándar de oro en las aplicaciones de diagnóstico molecular, realizar esta técnica requiere numerosos pasos de trabajo manuales que consumen mucho tiempo y son propensos a errores, incluida la preparación de soluciones de trabajo, la extracción de ácidos nucleicos y la transferencia, junto con la mezcla, a los dispositivos de amplificación, para lo que es necesario equipo costoso y personal altamente capacitado. Estos inconvenientes técnicos podrían evitarse utilizando la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos<sup>11,12,13</sup>. Más recientemente, los ensayos de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) se han utilizado cada vez más para la detección rápida específica de especies de numerosos hongos, incluido *A. fumigatus*.<sup>14</sup> La tecnología LAMP, descrita por primera vez en 2000,<sup>15</sup> típicamente involucra de 4 a 6 cebadores en cada reacción y tiene varias supuestas ventajas sobre los diagnósticos basados en PCR. Estos incluyen tiempos de reacción más rápidos, sensibilidad y especificidad potencialmente mejoradas, mayor tolerancia a los inhibidores de la muestra, no se requiere un procesamiento adicional posterior a la reacción (p. ej., resolución de productos de PCR en geles de agarosa) y el uso de una única temperatura de reacción constante, lo que aumenta la posibilidad de detección. A pesar de estas ventajas, los ensayos LAMP se han aplicado con mucha menos frecuencia a la detección de otros rasgos genéticos clave, como la resistencia a los fungicidas.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) son un grupo de enfermedades que han incrementado progresivamente en las dos últimas décadas, fundamentalmente en ámbito nosocomial. Su importancia radica en la morbilidad y mortalidad secundarias a estos procesos, especialmente en el caso de los causados por hongos filamentosos. Este aumento en la incidencia de las infecciones causadas por hongos es debido al incremento en el número de personas que viven con VIH-Sida; personas con fármacos inmunosupresores como postransplantados de órganos; al uso de quimioterapia para el tratamiento de neoplasias y al incremento en la esperanza de vida. Durante la última década, se han observado otros factores que incrementan el riesgo de tener infecciones por hongos filamentosos, como la influenza y más recientemente la COVID 19; las cuales causan daño epitelial y endotelial alveolar, deterioro de la actividad mucociliar agravada por disfunción de las células inmunes y desregulación del sistema inmunitario; siendo el género *Aspergillus* el tipo de hongo filamentosos más frecuentemente relacionado con infecciones fúngicas invasivas en el INER (Figura 1). Esta infección es considerada como una de las IFI con mayor mortalidad derivado del retraso en el inicio oportuno de tratamiento antifúngico por un diagnóstico tardío.

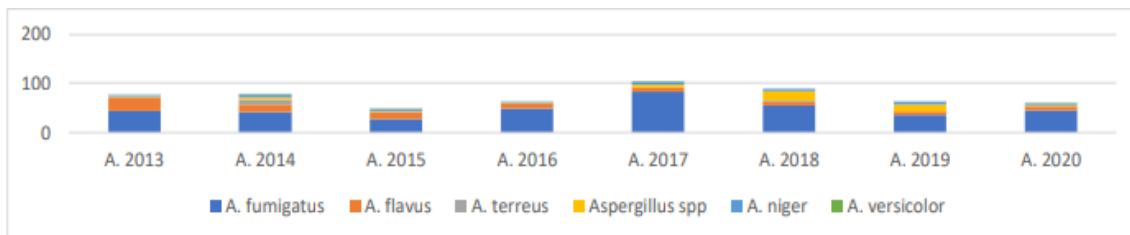


Figura 1. Prevalencia por año de los casos de Aspergilosis reportados en el INER de 2013 a 2020, de acuerdo a su género y especie.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de un ensayo de amplificación visual isotérmica de ácidos nucleicos para una detección rápida de *Aspergillus* spp y sus mecanismos de resistencia a antifúngicos?

## **OBJETIVOS.**

### Generales:

- Conocer el rendimiento diagnóstico de un ensayo de amplificación visual isotérmica de ácidos nucleicos para una detección rápida de *Aspergillus* spp y sus mecanismos de resistencia a antifúngicos

### Específicos:

- Desarrollar un ensayo de amplificación LAMP visual para la detección rápida de *Aspergillus* y genes asociados a resistencia a antifúngicos
- Determinar la sensibilidad de un ensayo de amplificación visual isotérmica de ácidos nucleicos para una detección rápida de *Aspergillus* spp y sus mecanismos de resistencia a antifúngicos.
- Determinar la especificidad de un ensayo de amplificación visual isotérmica de ácidos nucleicos para una detección rápida de *Aspergillus* spp y sus mecanismos de resistencia a antifúngicos.
- Evaluar el valor predictivo negativo de un ensayo de amplificación visual isotérmica de ácidos nucleicos para una detección rápida de *Aspergillus* spp y sus mecanismos de resistencia a antifúngicos.
- Evaluar el valor predictivo positivo de un ensayo de amplificación visual isotérmica de ácidos nucleicos para una detección rápida de *Aspergillus* spp y sus mecanismos de resistencia a antifúngicos



## **JUSTIFICACIÓN.**

La capacidad de proporcionar una identificación oportuna de los agentes causantes de las infecciones del tracto respiratorio inferior puede promover mejores resultados para los pacientes. Las opciones actuales de pruebas de diagnóstico incluyen cultivos, pruebas moleculares y detección de antígenos. Los métodos tradicionales de diagnóstico microbiológico actualmente son demasiado lentos y tienen poca sensibilidad. El diagnóstico molecular para procesos infecciosos parece ser una alternativa más precisa. Sin embargo, para realizar una PCR son necesarios múltiples procesos que requieren tiempo y personal capacitado para realizar las técnicas. Se necesitan herramientas de diagnóstico molecular rápidas y fáciles de realizar. Se han desarrollado métodos de amplificación isotérmica para la detección de ácidos nucleicos en muestras clínicas a fin de sortear los problemas asociados con la PCR en Tiempo Real. Los métodos de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) han ganado popularidad en la detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de agentes infecciosos. LAMP ha demostrado su superioridad sobre la PCR mediante la amplificación específica del ADN objetivo, incluso en presencia conjunta de secuencias no objetivo, al tiempo que elimina la necesidad de múltiples ciclos de temperatura y tiempos de reacción prolongados. Se han realizado varios avances a lo largo de los años para mejorar la eficiencia del ensayo LAMP y se ha combinado con métodos colorimétricos para detección visual que permiten tener una identificación rápida de las muestras positivas. Las mejoras han permitido la creación de plataformas diagnósticas en el punto de atención eficaces y rápidas. Por estos motivos y aprovechando la experiencia previa con la técnica LAMP para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, proponemos un método LAMP para mejorar las detecciones de aspergillus.

## **HIPÓTESIS**

### HIPÓTESIS NULA

Ho:

La sensibilidad y especificidad de un ensayo de amplificación visual isotérmica de ácidos nucleicos para una detección rápida de *Aspergillus* spp y mecanismos de resistencia a antifúngicos no es mayor al 80%

### HIPÓTESIS ALTERNA

Ha:

La sensibilidad y especificidad de un ensayo de amplificación visual isotérmica de ácidos nucleicos para una detección rápida de *Aspergillus* spp y mecanismos de resistencia a antifúngicos es mayor al 80%

## **METODOLOGÍA**

### **Diseño del Estudio: Transversal analítico**

#### **Área de investigación**

##### **a) Lugar del estudio**

Servicio de Microbiología Clínica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

##### **b) Descripción de la población de estudio.**

La validación de la técnica en evaluación se realizará con muestras de cultivos de cepas ATCC de diferentes especies de *Aspergillus* (*Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus brasiliensis* (16404) y que cuenten con genes con resistencia a los diferentes fármacos antifúngicos. Se realizará previamente un proceso de purificación de material genético. La evaluación se realizará al remanente de muestra de LBA o Aspirados bronquiales, de pacientes que hayan ingresado al INER y a los que se les solicite cultivo de hongos y prueba de galactomanano por sospecha de una aspergilosis pulmonar invasiva.

##### **c. Procedimiento del estudio.**

Se realizará el cultivo de las cepas de referencia con base en las especificaciones del fabricante, una vez obtenidas el crecimiento en los medios de cultivo, se realizará un paso previo de extracción del ADN para poder realizar el ensayo en evaluación.

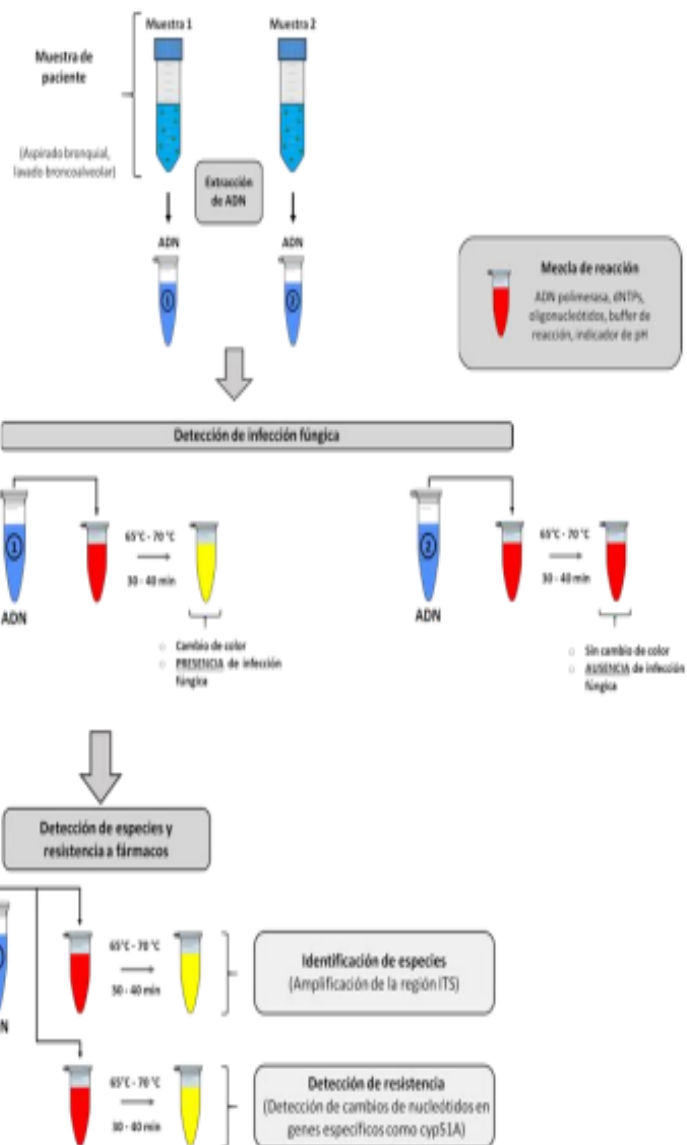


Fig. 1 Resumen gráfico del ensayo sobre las cepas de referencia y el remanente de las muestras

## I. Extracción de ADN de las muestras de pacientes

La extracción de ADN se puede realizar de las siguientes muestras biológicas: lavado bronco alveolar, aspirado bronquial y plasma. Añadir 250 µL de muestra biológica a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se realiza un pretratamiento a la muestra, añadir 250 µL de cisteína al 1% (agente mucilaginoso), incubar durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente tratar las muestras de la siguiente manera. Centrifugar a 12 000 g a 4°C durante 5 minutos, posteriormente eliminar el sobrenadante y agregar 200 µL de solución de yatalasa (Yatalasa al 1 % TaKaRa. RNasa A, Fosfato de sodio 10 mM (pH 6), Cloruro de sodio 0.8 M y EDTA 50 mM (pH7), estéril) e incubar durante 30 min a 37°C en agitación, agregar 300 µl de buffer de lisis (tiocianato de guanidinio 2 M, ditiotreititol 80 mM, citrato de sodio 25 mM y glucógeno 20 µg/ml, pH 6), agitar vigorosamente durante 15 segundos e incubar a 80°C durante 10 min, posteriormente enfriar a temperatura ambiente, agregar v/v etanol al 100%, y 20 µL de perlas magnéticas (10 mg/mL), homogenizar e incubar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante, recolectar las perlas magnéticas con DynaMagImán TM -2 (Life Technologies, EE. UU.). Lavar las perlas dos veces con etanol al 70%. Finalmente, agregar 50 µL de agua libre de RNasas, incubar 5 min, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo estéril. El ADN purificado se puede almacenar a -30°C.

## II. Detección de la infección fúngica

El objetivo de esta etapa es la determinación de la presencia de la infección fúngica en la muestra. La detección molecular del hongo en las muestras de pacientes se realizará mediante la amplificación de un fragmento de los genes 18S y 28S, que codifican para ARN ribosomal y tienen una limitada velocidad de cambios evolutivos. Para encontrar las regiones genómicas que se utilizarán como templados de amplificación se realizó un alineamiento con las secuencias de ARN ribosomal del género *Aspergillus* de las cuatro especies más comunes reportadas como causantes de IFI (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*). Como se muestra en la Figura 2, existen diversas secuencias conservadas en las regiones ribosomales de las distintas especies que pueden ser utilizadas como blanco de amplificación.

Ya que la finalidad del presente proyecto es desarrollar un método de diagnóstico de infecciones fúngicas rápido, fácil de usar y aplicable en el punto de atención del paciente, se requiere utilizar el menor equipo posible.

Los métodos de detección basados en la PCR requieren de equipos costosos y altamente especializados para realizar la amplificación de los genes de interés, como los termocicladores para reacciones en tiempo real. Sin embargo, una alternativa a la PCR es la amplificación LAMP, la cual es una técnica que permite realizar múltiples copias de una región genómica aplicando una única temperatura de reacción. Para realizar la técnica LAMP, el juego de oligonucleótidos descritos en la Tabla 1 serán utilizados como plantados para el diseño de los iniciadores que se usarán en la reacción isotérmica. Cada par de oligonucleótidos se optimizará para obtener el mayor rendimiento de amplificación.

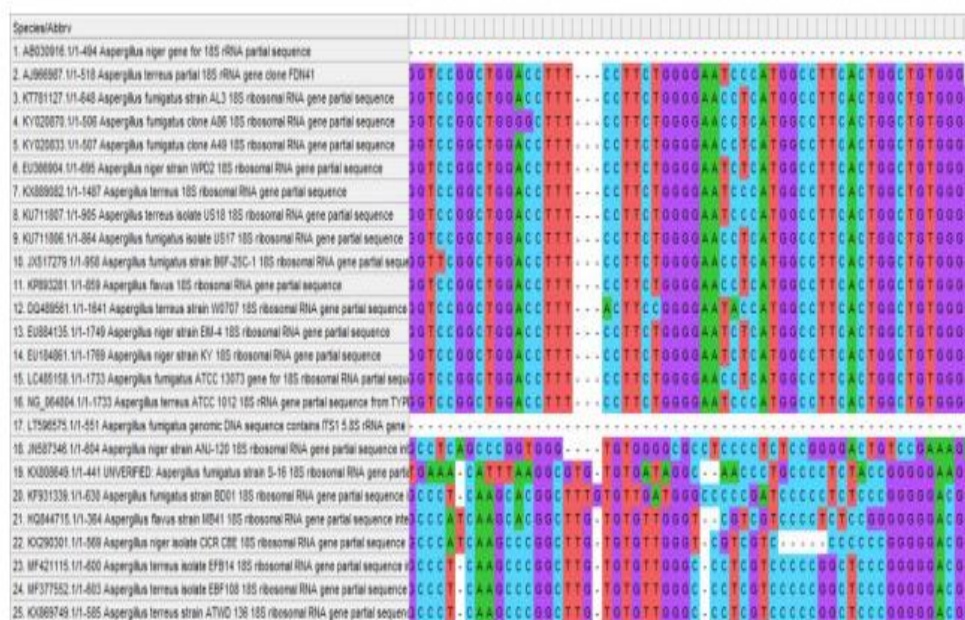


Figura 2. Alineamiento de las secuencias ribosomales de cuatro especies distintas de *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*). Secuencias obtenidas de la base de datos NCBI. Alineamiento realizado con el servidor Clustal Omega EMBL-EBI.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados como templado para realizar el diseño de los iniciadores para LAMP que amplificarán las regiones ribosomales conservadas del género *Aspergillus*

Región 18S	NS1	GTAGTCATATGCTTGCTC
	NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC
	NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC
	NS4	CTCCGTCAATTCCTTTAAG
Región 28S	LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC
	LR3	CCGTGTTCAAGACGGG
	LR3R	GTCTTGAAACACGGACC
	LR6	CGCCAGTTCTGCTTACC

La amplificación de los genes blanco se realizará con la enzima ADN polimerasa Bst 2.0, la cual es una proteína homóloga de la ADN polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus*. Esta enzima se incluye en la mezcla de reacción del kit a utilizar, WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) del fabricante NEB. El ADN extraído y purificado se utilizará para preparar la reacción de amplificación con un volumen final de 25 µL en tubos de 0.2 mL.

Los volúmenes de cada componente de la mezcla de reacción se describen en la Tabla 2. La mezcla final se incubó a 65°C por un periodo de 30 a 40 minutos. La detección de la amplificación será identificada a simple vista mediante un cambio de color en la mezcla de reacción (Figura 3). Las muestras positivas tendrán un cambio de color de rosa a amarillo debido a un cambio de pH cuando ocurre la amplificación de la cadena de ADN de interés.

Tabla 2. Componentes y volúmenes de la reacción LAMP para la detección de hongos

Componente	Muestra de ADN (µL)	Control sin templado (µL)
Mezcla de reacción	12.5	12.5
Mezcla de iniciadores	2.5	2.5
ADN de la muestra	1	-
dH2O	9	10
<b>Volumen final</b>	<b>25</b>	<b>25</b>



Figura 3. Detección de amplificación mediante cambio de color en la mezcla de reacción. El kit WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) de NEB, contiene un indicador de pH en la mezcla de reacción que cambia de color cuando la polimerasa de ADN *Bst* 2.0 amplifica el gen de interés.

### III. Identificación de especies de *Aspergillus* mediante la detección visual de la reacción de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos.

Después de la detección de una muestra positiva, la siguiente etapa es determinar la especie del hongo responsable de la infección. Para diferenciar entre especies utilizando la técnica LAMP es necesario amplificar regiones de genes con secuencias únicas de cada especie. Una de las regiones de ADN seleccionadas es el espaciador transcrito interno (ITS, del inglés Internal Transcribed Spacer) la cual es la porción del ARN ribosomal con una mayor velocidad evolutiva. De hecho, las secuencias ITS son conocidas como los marcadores oficiales para la identificación de hongos. Sin embargo, algunos genes codificantes de proteínas también pueden ser utilizados para diferenciar entre especies, por ejemplo, las regiones codificantes de las subunidades de la ARN polimerasa o la secuencia del gen de la beta-tubulina. El método de amplificación de ADN debe de identificar cambios de un solo nucleótido entre la secuencia original y la secuencia mutante para discriminar entre especies distintas. Para lograr la identificación de esos ligeros cambios en la secuencia se utilizará una modificación de la técnica de amplificación original llamada LAMP activable por iniciador (PALAMP por sus siglas en inglés).

La técnica PA-LAMP utiliza un oligonucleótido que tiene un residuo de ARN complementario al sitio de la mutación y en el extremo 3' un espaciador C3 que bloquea la amplificación. Si la secuencia mutante está presente en la muestra, el oligonucleótido se une completamente a la cadena de ADN y la enzima RNAsa H2 cataliza el corte del residuo de ARN y activa la amplificación del oligonucleótido.



Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados como plantados para el diseño de los iniciadores en las reacciones de identificación y discriminación de especies de *Aspergillus* mediante la amplificación de las regiones ITS y el gen beta tubulina.

Internal Transcribed Spacer (ITS)	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
$\beta$ -Tubulina	<i>A. fumigati</i>	CGGCAACATCTCACGATCTGACTCGC
	<i>A. niger</i>	ACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGT
	<i>A. flavus</i>	CGGTCAGGAGTTGCAAAGCGTTTTCA
	<i>A. terreus</i>	ACCATCCTGGGACAGATTCTYCACGC

Aprovechando la capacidad de la técnica PA-LAMP para detectar sustituciones de un solo nucleótido, se seleccionaron las secuencias de la región ITS y el gen codificante de beta tubulina para amplificar y diferenciar entre las diferentes especies de hongos patógenos. Las secuencias seleccionadas se alinearon para identificar cambios de un solo nucleótido en las cadenas de ADN. En la Tabla 3 se muestran diferentes oligonucleótidos que reconocen las secuencias ITS y beta tubulina, respectivamente. Los iniciadores de ambos grupos serán utilizados como modelo para el diseño de los oligonucleótidos específicos para la amplificación con PA-LAMP. Los componentes de la reacción y los volúmenes están descritos en la Tabla 4. El volumen final de reacción es de 30  $\mu$ L el cual se incubó a 63°C durante 30 a 40 minutos.

Tabla 4. Componentes y volúmenes para la reacción PA-LAMP

Componente	Reacción con muestra de ADN ( $\mu$ L)	Reacción control sin ADN ( $\mu$ L)
Buffer de reacción	15	15
4 mM MgSO <sub>4</sub>	2	2
Mezcla de oligonucleótidos	5	5
dNTPs	2	2
Polimerasa de ADN Bst	1	1
RNAse H2	1	1
Muestra de ADN	2	-
H <sub>2</sub> O	2	4
<b>Volumen final</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

Para los ensayos de identificación de la especie de *Aspergillus* spp, se empleará azul de hidroxinaftol (CAS No. 63451–35–4) de la marca Sigma-Aldrich o Merck Millipore. El azul de hidroxinaftol será preparado disolviéndolo en agua destilada para preparar una solución stock de 20 mM, a partir de la cual se realizará una dilución para pre-adicionar 120  $\mu$ M a la mezcla de reacción de cada ensayo. La adición de esta sustancia servirá para evidenciar el desarrollo de la reacción de la amplificación mediante un cambio de color perceptible a simple vista, de violeta a azul cuando el target genético esté presente; es decir, cuando la muestra sea “positiva” a la especie fúngica en cuestión (Figura 4).

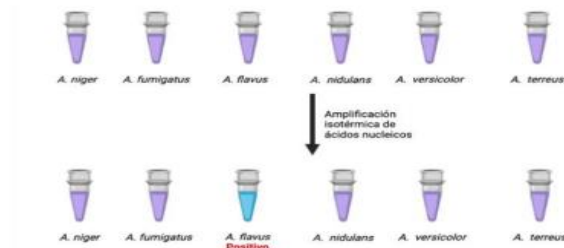


Figura 4. Ejemplo de la detección de especie de *Aspergillus* sp mediante la amplificación isotérmica propuesta.

#### IV. Detección de la presencia de mutaciones que confieren resistencia a antifúngicos en especies de *Aspergillus* mediante la detección visual de la reacción de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos

La determinación de la resistencia a antifúngicos se realizará mediante la detección de mutaciones en la secuencia de genes como *cyp51A* y *ERG11*, los cuales están relacionados con desarrollo de resistencia a azoles. Por ejemplo, se ha descrito que algunas sustituciones de aminoácidos en el gen *cyp51A* confiere resistencia a la especie *A. fumigatus* al fármaco itraconazol. El protocolo de detección de mutaciones relacionadas a resistencia es similar al utilizado para la discriminación de especies. Las secuencias de ADN de los genes de interés se descargarán y alinearán para detectar las posiciones de los cambios únicos de nucleótidos los cuales se utilizarán para el diseño de los oligonucleótidos que se aplicarán en la reacción PA-LAMP. Las muestras positivas a alguna resistencia se identificarán por detección visual mediante un reportero de pH. El volumen final de reacción será de 30  $\mu$ L y se incubará a 63°C durante 30-40 minutos.

Para la detección visual de la presencia de mutaciones o *targets* genéticos que confieren resistencia a antifúngicos a diferentes especies de *Aspergillus* spp, se empleará púrpura de metacresol (CAS No. 2303-01-7) de la marca Sigma-Aldrich o Merck Millipore. El púrpura de metacresol será preparado disolviéndolo en agua destilada para preparar una solución stock de 50mM, a partir de la cual se realizará una dilución para pre-adicionar 100  $\mu$ M a la mezcla de reacción de cada ensayo. La adición de esta sustancia servirá para evidenciar el desarrollo de la reacción de la amplificación mediante un cambio de color perceptible a simple vista, de morado a amarillo cuando el *target* genético esté presente, es decir, cuando exista resistencia a los antifúngicos en cuestión (Figura 5).



Figura 5. Ejemplo de la detección de *targets* genéticos de resistencia a antifúngicos mediante la amplificación isotérmica propuesta.

## DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

<b>Variable</b>	<b>Fuente</b>	<b>Método de Medición</b>	<b>Unidad</b>	<b>Escala de Medición</b>
<b><u>Infección fúngica invasiva</u></b>	<b>Paciente</b>	<b>Escala</b>	<b>Posible Probable Probada</b>	<b>Cualitativa nominal</b>
<b><u>Pcr lamp</u></b>	<b>Paciente</b>	<b>Visual</b>	<b>Cambio de coloración</b>	<b>Cualitativa</b>
<b><u>Edad</u></b>	<b>Evaluación clínica</b>	<b>Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento actual.</b>	<b>años</b>	<b>Cuantitativa continua</b>
<b><u>Género</u></b>	<b>Interrogatorio directo</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Masculino Femenino</b>	<b>Cualitativa nominal</b>
<b><u>Comorbilidades</u></b>	<b>Interrogatorio directo</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Cualitativa nominal</b>
<b><u>Cultivo</u></b>	<b>Paciente</b>	<b>ESCALA</b>	<b>UFC</b>	<b>Cuantitativa discreta</b>

## **UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA**

### **Criterios de inclusión y exclusión:**

#### **A) Criterios de inclusión**

- ✓ Pacientes mayores de 18 años
- ✓ Pacientes con remanente de muestra y con solicitud de estudios de cultivo de hongos y galactomanano
- ✓ Pacientes que acepten participar y firmen consentimiento informado

#### **B) Criterios de exclusión**

- ✓ Pacientes que la muestra no sea suficiente obtener un remante de muestra

### **Captura, procesamiento, análisis e interpretación de la información.**

Con la información recabada se realizará una base de datos, la cual permitirá realizar el procesamiento de la información. El análisis estadístico se realizará utilizando el paquete estadístico, SPSS 27. Se calculará: Sensibilidad: definida como el número de resultados verdaderos positivos dividido por la suma de los resultados verdaderos positivos y falsos negativos; Especificidad: definida como el número de resultados negativos verdaderos dividido por la suma de resultados negativos verdaderos y falsos positivos.

## TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Número necesario de sujetos de investigación.

Para el cálculo de tamaño de muestra para el proceso de evaluación clínica se realizó con la fórmula para comparar la sensibilidad entre dos pruebas diagnósticas:

$$n = \frac{\{Z\alpha\sqrt{(1+C)\bar{\Pi}(1-\bar{\Pi})} + Z\beta\sqrt{Cp_1q_1 + p_2q_2}\}^2}{(C)IC^2}$$

En donde:

$Z\alpha$  (desviación normal estandarizada para el nivel establecido) = 1.64

$Z\beta$  (desviación normal estandarizada para el nivel establecido) = 0.84

C = Relación entre los componentes de ambos grupos = 1:1

$\bar{\Pi}$  ( $p_1 + p_2/2$ ) =  $0.80 + 0.90 / 2 = 0.85$ .

$p_1$  (sensibilidad del grupo 1) = 0.80,  $q_1 = 1 - 0.80 = 0.20$ .

$p_2$  (sensibilidad del grupo 2) = 0.80,  $q_2 = 1 - 0.80 = 0.20$ .

IC = 0.1.

El cálculo con la forma anterior fue de 90 sujetos, si la sensibilidad de la prueba conocida es de 0.80, y se espera que la sensibilidad de la nueva prueba sea de 0.8 con IC del 95% 0.75 a 85%, a un nivel de confianza del 95% y poder del 80%, con una relación 1:1

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

En cuanto a la estadística descriptiva se utilizaron medidas de resumen tales como n y porcentajes para variables cualitativas, medidas de tendencia central para variables cuantitativas. Para la estadística inferencial, se realizó prueba de chi cuadrado, así como se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, así como tablas de contingencia para RR, Se obtuvo el cálculo del valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), sensibilidad y especificidad.

Los cálculos se realizaron por medio del paquete SPSS Statistics v20.

Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0.05$

### ETAPAS.

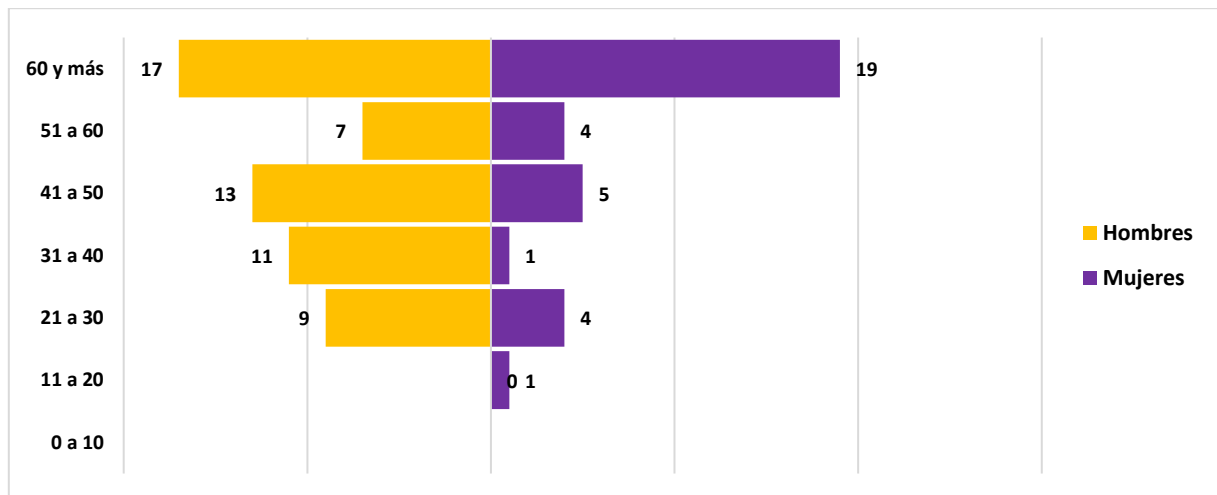
- PRIMERA ETAPA: Inclusión de pacientes.
- SEGUNDA ETAPA: Evaluación de datos y análisis de resultados.
- TERCERA ETAPA: Realización de conclusiones.
- CUARTA ETAPA: Preparación de manuscrito y publicación

## RESULTADOS

### **Características de la población**

Se incluyeron un total de 91 pacientes con galactomanano positivo y sospecha clínica de aspergilosis pulmonar invasiva por parte del médico tratante, posteriormente se les solicitó cultivo para hongos, se encontró que 36% (31/91) de los pacientes a los que se les solicitaron las pruebas para descartar una infección fúngica invasiva (IFI) no tenían criterios clínicos ni radiográficos para sospechar de una aspergilosis pulmonar invasiva. El 54% de los pacientes se clasificó como enfermedad fúngica invasiva probable por contar con factores de riesgo, hallazgos clínico-radiológicos y un estudio micológico positivo. Un 16% de los pacientes se clasificó como IFI posible.

La edad promedio de las personas incluidas en el estudio fue de  $51.92 \pm 11.99$  años. El 63% (57/91) de las personas a las que se realizó la prueba fueron hombres (figura 2).



*Figura 2. Distribución por sexo y edad.*



La enfermedad pulmonar multinodular en estudio y neumonía por COVID-19 fueron los diagnósticos más frecuentes por los cuales se solicitó un estudio serológico y cultivo para descartar una IFI por *Aspergillus spp.* (Tabla 1).

	Sin Criterios EORTC	Posible IFI	Probable IFI	Total
Enfermedad pulmonar multinodular	8	1	12	21 (23%)
COVID – 19	4	0	17	21 (23%)
Neumonía paciente VIH	0	10	5	15 (16%)
NAC	4	0	5	9 (10%)
Otros	6	0	1	7 (8%)
Absceso pulmonar	2	0	0	2 (2%)
Tumor pulmonar	1	0	1	2 (2%)
Tuberculosis pulmonar	1	0	1	2 (2%)
Neumonía atípica	0	1	1	2 (2%)
Tumor Mediastinal	1	0	0	1 (1%)
Neumonía Post-obstructiva	1	0	0	1 (1%)
Neumonía Broncoaspiración	1	0	0	1 (1%)
Enfermedad pulmonar quística	1	0	0	1 (1%)
Cáncer Pulmonar	1	0	0	1 (1%)
Sepsis abdominal	0	0	1	1 (1%)
Neumonía Nosocomial	0	0	1	1 (1%)
Exacerbación EPOC	0	1	0	1 (1%)
Derrame pleural en estudio	0	1	0	1 (1%)
Bronquiectasias	0	0	1	1 (1%)
	31	14	46	91

Tabla 1. Diagnósticos de las personas incluidas en el estudio.

### Rendimiento diagnóstico de PCR para *Aspergillus*

De las 91 muestras analizadas en total, 16 muestras se reportaron positivas por PCR lamp y el resto fueron negativas para *Aspergillus spp.* Para la detección de *Aspergillus spp.*, la sensibilidad por medio de la prueba molecular fue del 27% y la especificidad encontrada fue del 100% (Tabla 2).

CRITERIOS EORTC							
Aspergillus spp	(método de referencia)		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR (-)
	Con	Sin					
Positivo	16	0					
Negativo	44	31	27	100	100	41	0.73

**Tabla 2.** Comparación entre el rendimiento clasificación por criterios EORTC y *Aspergillus spp* ELITE MGB PCR. VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo; LR(-): Cociente de Probabilidad para un test negativo.

En las personas con factores de riesgo, criterios clínicos y micológicos clasificados como infección fúngica probable, la sensibilidad del *Aspergillus spp PCR lamp* fue del 30%, con una especificidad del 100 %, el valor predictivo positivo es del 100% con un LR de 0.7 (Tabla 3).

CRITERIOS EORTC (Probable)							
Aspergillus spp	(método de referencia)		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR (-)
	Con	Sin					
Positivo	14	0					
Negativo	32	31	30	100	100	49	0.7

**Tabla 3.** Comparación entre el rendimiento clasificación por criterios EORCT y Aspergillus spp ELITe MGB RT-PCR. VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo; LR(-): Cociente de Probabilidad para un test negativo

En los pacientes con criterios clínicos de IFI posible según los criterios EORTC/MSG, la sensibilidad del *Aspergillus spp ELITe MGB* fue del 14%, con una especificidad del 100 %, el valor predictivo positivo es del 100% con un LR de 0.86.

Aspergillus spp	CRITERIOS EORTC (Posible)		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR (-)
	(método de referencia)						
	Con	Sin					
<b>Positivo</b>	2	0					
<b>Negativo</b>	12	31	14	100	100	72	0.86

**Tabla 4.** Comparación entre el rendimiento clasificación por criterios EORCT y Aspergillus spp ELITe MGB PCR. VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo; LR (-): Cociente de Probabilidad para un test negativo

## DISCUSIÓN.

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) son un grupo de enfermedades que han aumentado progresivamente en las últimas dos décadas, principalmente en el ámbito nosocomial, las cuales implican gran morbilidad y mortalidad, ante lo cual el diagnóstico temprano es vital dado que esto sirve para un tratamiento adecuado y evitar complicaciones.

Se requiere pruebas diagnósticas más exactas y rápidas, que ayude a la toma de decisiones, es por eso por lo que las pruebas en el punto de atención cada vez son más utilizadas en la práctica clínica.

Por lo que el presente estudio tuvo como objetivo la evaluación y validación de prueba de ácidos nucleicos con la finalidad de la detección rápida de *Aspergillus spp*, en población con factores de riesgo para esta infección. Estos datos indican que aquellos que fueron clasificados como probables la sensibilidad del *Aspergillus spp pcr* fue del 30%, con una especificidad del 100 %, el valor predictivo positivo es del 100% con un LR de 0.7, y en aquellos clasificados como posible la sensibilidad del *Aspergillus spp ELITE MGB* fue del 14%, con una especificidad del 100 %, el valor predictivo positivo es del 100% con un LR de 0.86.

Dentro de las limitaciones de nuestro estudio se puede señalar que pudieron existir el tamaño de la muestra fue reducido, lo cual en futuros estudios se pudiesen incluir mas pacientes para su análisis.

## **CONCLUSIONES.**

Por medio del presente estudio se determinó que las personas con factores de riesgo, criterios clínicos y micológicos clasificados como infección fúngica probable, la sensibilidad del *Aspergillus spp pcr* fue del 30%, con una especificidad del 100 %, el valor predictivo positivo es del 100% con un LR de 0.7, y en los pacientes con criterios clínicos de IFI posible según los criterios EORTC/MSG, la sensibilidad del *Aspergillus spp pcr* fue del 14%, con una especificidad del 100 %, el valor predictivo positivo es del 100% con un LR de 0.86.

## **REFERENCIAS.**

1. D.C. Cole, N.P. Govender, A. Chakrabarti, J. Sacarlal, D.W. Denning. Improvement of fungal disease identification and management: combined health systems and public health approaches. *Lancet Infect Dis*, 17 (2017), pp. e412-e419
2. Quindós G. Epidemiología de las micosis invasivas: Un paisaje en continuo cambio]. *Rev Iberoam Micol*. 2018 octubre-diciembre;35(4):171-178.
3. M. Cuenca-Estrella, M. Bassetti, C. Lass-Floerl, Z. Racil, M. Richardson, T.R. Rogers. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother*, 66 (2011), pp. i15-i24.
4. Gangneux J-P, Bougnoux M-E, Hennequin C, Godet C, Chandener J, Denning DW, et al. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Med* 2016;26(4):385–90.
5. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008;46(3):327–60.
6. Jose Cadena, George R Thompson 3rd , Thomas F Patterson. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment *Infect Dis Clin North Am*. 2021 Jun;35(2):415-434
7. P. Ramanan, N.L. Wengenack, E.S. Theel. Laboratory diagnostics for fungal infections: a review of current and future diagnostic assays *Clin Chest Med*, 38 (2017), pp. 535-
8. M. Arvanitis, T. Anagnostou, B.B. Fuchs, A.M. Caliendo, E. Mylonakis. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, 27 (2014), pp. 490-526
9. David Terrero-Salcedo and Margaret V. Powers-Fletcher. Updates in Laboratory Diagnostics for Invasive Fungal Infections *Journal of Clinical Microbiology* Volume 58, Issue 6, 26 May 2020
10. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, and et al. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. 2008. 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* 46:1813–182
11. M.V. Powers-Fletcher, K.E. Hanson. Molecular diagnostic testing for *Aspergillus*. *J Clin Microbiol*, 54 (2016), pp. 2655-2660

12. Nupur Garg, Farhan Jalees Ahmad, Sudeshna Kar. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Current Research in Microbial Sciences* 3 (2022) 100120.
13. Tang Q, Tian S, Yu N, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 2016;54:950-955.
14. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*
15. Yu L-S, Rodriguez-Manzano J, Malpartida-Cardenas K, et al. Rapid and sensitive detection of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* by tandem-repeat loop-mediated isothermal amplification. *J Mol Diagn.* 2018