Protocolo para el diagnóstico de Candidiasis Invasiva mediante amplificación de DNA ribosomal por PCR semi-nidada en muestras de plasma.

GLOSARIO

ADN: ácido desoxirribonucleico; el material genético de los seres vivos.

Candidiasis Invasiva: presencia de *Candida spp.* En sangre o fluidos corporales normalmente estériles.

DNTP: un nucleosido trifosfato que carece de grupos hidroxilo en los carbono 2 y 3 del azúcar pentosa.

DNA polimerasa: una enzima que asocia un desoxirubunocleotido complementario a un desoxiribunocleotido en un templado de cadena de ADN, con una unión fosfodiester al grupo 3 hidroxilo del último nucleótido incorporado de la cadena creciente durante la duplicación.

Lisis: la destrucción de las células por virus ó químicos ó tratamiento físico.

PCR: reacción en cadena de polimerasa; una técnica para amplificar un segmento específico de ADN utilizando una DNA polimerasa termoestable, desoxirribonucleotidos, secuencias cebadoras en múltiples ciclos de denaturación, renaturación, y síntesis de ADN.

Primer ó cebador: un corto oligonucleótido que hibridiza con una cadena de templado y provee un terminal 3 hidroxilo para la iniciación de la síntesis de ácidos nucléicos.

Proteólisis: degradación enzimática de una proteína.

RESUMEN

Las infecciones micóticas son propias del paciente inmunocomprometido o severamente invadido. Se ha reconocido el riesgo mayor de invasión por *Candida* en pacientes neutropénicos, pero actualmente hay otras poblaciones de pacientes críticos no-neutropénicos en alto riesgo de infección.

La candidiasis invasiva es la cuarta causa de infección del torrente circulatorio en el ambiente hospitalario, con una mortalidad atribuible de hasta el 50%. El método estándar de diagnóstico se basa en hemocultivos, los cuales tienen un rendimiento del 50% según se ha documentado por estudios post mortem. Los análisis preliminares han demostrado alta precisión para pruebas de diagnóstico molecular por PCR en infecciones micóticas amplificando DNA ribosomal; sin embargo, dichos estudios no se han validado con el uso de

muestras clínicas. Nuestra intención es estandarizar el método para la amplificación de DNA ribosomal con Cebadores pre-elaborados que amplifican la región ITS 2 completa de *Candida spp*. y mediante protocolo de PCR nidada, amplificar segmentos específicos de 9 especies clínicamente relevantes de *Candida,* esta vez a partir de muestras clínicas de sangre. Se protocolizará dicha técnica en muestras de sangre para así ponerla en práctica posteriormente en un ensayo comparativo de efectividad diagnóstica de las diversas técnicas de diagnóstico actualmente disponibles para candidiasis invasiva.

PALABRAS CLAVE.

Candidiasis invasiva, diagnóstico molecular, PCR semi-nidada.

INVESTIGADORES.

William Pascual Ospina Barragán, Profesor Asesor Jorge Cortés Luna

INTRODUCCION

Los adelantos técnico-científicos en medicina han logrado mejorar la supervivencia de pacientes con enfermedades graves; sin embargo la exposición prolongada de dichos pacientes al medio hospitalario y una variedad de condiciones subyacentes propias del paciente predisponen a la colonización y posterior diseminación de infección por agentes oportunistas incluyendo diferentes especies de hongos. Las infecciones del torrente sanguíneo de los pacientes críticamente enfermos determinan un factor de mortalidad que se eleva hasta el 50%. Tradicionalmente con la sospecha de infección bacteriemica se solicitan hemocultivos seriados y se autoriza al clínico para iniciar antibióticoterapia dirigida contra los microorganismos más probables según datos epidemiológicos locales y susceptibilidad a los antibióticos conocida en el mismo lugar. En Estados Unidos *Candida spp.* Representa la cuarta causa más frecuente de septicemia con una mortalidad en promedio del 50%. Según datos locales de reportes de hemocultivos positivos, la infección por *Candida spp.* se encuentra ubicada dentro de las primeras diez causas de origen infeccioso. Estos datos son más dramáticos aún si la población a estudio reúne algunos factores de riesgo tales como hospitalización prolongada, ingreso a UCI, uso previo de antibióticos de amplio espectro, ventilación mecánica prolongada, sedación profunda, presencia de dispositivos de invasión como sondas y catéteres, nutrición parenteral total, neutropenia, los cuales son aditivos de forma independiente y predisponen fisiopatológicamente a la infección mediante la colonización superficial micótica previa y la disrupción de las barreras naturales de defensa y mecanismos de respuesta inmunitaria. De tal forma se han desarrollado herramientas de predicción de colonización e infección por hongos, las cuales desde un punto de vista epidemiológico justifican la búsqueda activa de microorganismos mediante cultivos y el inicio pronto y adecuado de la terapia antifungica más apropiada en espera de la confirmación microbiológica posterior.

El gold standard de infección micótica diseminada o invasiva lo constituyen los hemocultivos cuyo rendimiento para mejor los casos es del 50%; esto quiere decir que la mitad de los pacientes infectados por *Candida spp.* no se logrará documentar la infección micótica o solo se identificará en forma tardía. La supervivencia de pacientes con candidiasis diseminada depende en gran medida del pronto inicio de antimicóticos y de su actividad frente a la *Candida spp.* Aislada. Desde un punto de vista fármaco-económico, aquellos pacientes identificados de alto riesgo para colonización e infección micótica y con signos clínicos de infección es completamente justificado dar manejo empírico antimicótico con terapias efectivas pero no costosas y en esta medida es de vital importancia reconocer también algunos factores de riesgo independientes que determinan resistencia a antimicóticos habituales y de otro lado no costosos, por nombrar algunos la presencia de enfermedad hemato-oncológica y el uso previo (tres meses antes) de antimicóticos del tipo azol.

Es menester de la biotecnología y biología molecular con aplicación clínica desarrollar una herramienta de diagnostico para candidiasis invasiva rápida, simple que mejore la sensibilidad diagnóstica y con suficiente especificidad que permita hacer un diagnostico temprano y certero para dar tratamiento inequívoco, considerando de antemano mantener una relación costo: beneficio razonable. Las técnicas de extracción de ADN y amplificación por PCR se pueden modificar de tal forma que nos permitan esta meta.

JUSTIFICACIÓN.

La candidiasis invasiva es una infección de pacientes críticos con una mortalidad de hasta el 50%; el diagnóstico clínico es difícil por su heterogeneidad clínica y la herramienta estándar de diagnóstico actual está basada en los hemocultivos, los cuales, para las muestras de sangre, alcanzan una sensibilidad del 50% en el mejor de los casos, imponiendo un amplio sub-diagnóstico y retraso en el inicio de manejo antimicótico adecuado (1).

Es bien conocido que el inicio temprano de antibióticos en los casos de sepsis por microorganismos bacterianos tiene impacto directo sobre la mortalidad; en el caso de la candidiasis invasiva se acepta también que hay un impacto real sobre la mortalidad si los antimicóticos se inician en el lapso de 12 horas después de haber tomado los hemocultivos; sin embargo, los cultivos tradicionales tardan entre 48 y 72 horas y por tanto, el manejo antimicótico se inicia de forma empírica si el paciente reúne predictores de alto riesgo para infección por *Candida* (2).

Los clínicos tenemos a nuestra disposición tres tipos de medicamentos altamente activos frente a *Candida spp.* que incluyen polienos, azoles y equinocandinas, actuando en diversos procesos relacionados con la síntesis y estabilidad de la pared celular. Los polienos están dentro del arsenal farmacéutico por más de 50 años y mantiene alta actividad frente a la inmensa mayoría de especies de *Candida* clínicamente relevantes; su mayor inconveniente lo representa el riesgo de nefrotoxicidad que puede afectar hasta el 50% de los pacientes críticamente enfermos. Los azoles, constituyen la primera línea terapéutica frente a infecciones por *Candida spp.* debido a su eficacia, bajo costo y mínima toxicidad; sin embargo por el uso masivo para el tratamiento de otras micosis han surgido progresivamente cepas de *Candida albicans* y no *albicans* resistentes a los azoles. Las equinocandinas son medicamentos con un perfil de susceptibilidad adecuado y baja toxicidad, sin embargo por su reciente introducción siguen teniendo alto costo.

Mencionado dicho contexto, es entonces ideal conocer la especie de *Candida* infectante y de tal forma predecir la susceptibilidad al tratamiento con azoles, debido a que la elección inapropiada del antimicótico tendrá un impacto directo sobre la morbi-mortalidad del paciente.

Se propone una herramienta de diagnóstico rápido, con nivel óptimo de sensibilidad para decidir el inicio de manejo y con la especificidad suficiente y capacidad de discriminar al nivel de especie para de esta forma seleccionar el manejo antimicótico más apropiado desde un inicio o en fases tempranas del tratamiento y que además no represente costos inaceptablemente altos (relación costo : beneficio).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La candidiasis nosocomial es una infección micotica grave que ocurre principalmente en pacientes críticamente enfermos y que han tenido hospitalización prolongada por otas condiciones subyacentes.

El diagnostico de la candidemia ha sido tradicionalmente difícil por el bajo potencial de positividad de los hemocultivos. Aunque diversos métodos de laboratorio para la detección de anticuerpos específicos contra *Candida*, antígenos de *Candida* o metabolitos específicos de *Candida* se han desarrollado, estos tienen poca especificidad y continúan siendo largos y tediosos. Aun más, estos métodos son incapaces de diferenciar especies de *Candida* diversas, lo cual es fundamental para el inicio de la terapia antimicótica adecuada.

Dadas estas limitaciones diagnosticas, los métodos de detección ADN ofrecen un medio de diagnostico de candidiasis sistémica por un método más sensible.

Los trabajos hasta el momento realizados que involucran la amplificación de ADN por PCR se basan en el previo cultivo de sangre y no han probado su eficacia a partir de muestras clínicas directas. Adicionalmente debido al surgimiento de infecciones por *Candida spp.* diversas cuyo perfil de susceptibilidad ha antimicóticos es variable, se quiere disponer de un método diagnóstico que sea completamente sensible y a la vez suficientemente específico a nivel de especie.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Protocolizar una prueba de diagnóstico de candidiasis invasiva por amplificación de DNA ribosomal a partir de muestras de sangre.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar las condiciones óptimas para toma de muestra de sangre, cantidad ideal, tipo de anticoagulante y condiciones de transporte y almacenamiento de las mismas.

2. Definir protocolo de procesamiento para extracción de DNA genómico de *Candida* a partir de muestras de sangre.

3. Determinar las condiciones optimas de Reacción en Cadena de Polimerasa para nuestros primers.

4. Hacer concepto teórico de la sensibilidad y especificidad esperada de dicha prueba diagnóstica.

MARCO TEORICO.

La candidemia es la cuarta infección del torrente sanguíneo del paciente hospitalizado, particularmente prevalente en pacientes críticamente enfermos e inmunocomprometidos en los cuales se han vulnerado las barreras físicas. Dicha afección alcanza una mortalidad del 50%, con una mortalidad atribuible independiente de hasta el 30 a 40% en pacientes con malignidades hematológicas, y es mayor para las especies de *Candida albicans* y *tropicalis* y menor para *Candida parapsilosis* (3).

El diagnóstico tradicional de las infecciones invasivas por hongos levaduriformes, se basa en la observación directa, el cultivo y las pruebas serológicas, estas últimas dependientes de la liberación al medio de antígenos de la levadura y la creación de anticuerpos por parte del huésped.

Los hemocultivos son positivos entre el 40 y 60% de las candidiasis invasivas, según estudios de autopsias (4).

Las pruebas de detección no basadas en cultivo, como la detección de anticuerpos, antígenos y metabolitos carecen de sensibilidad y especificidad y además son demoradas en su realización y no reportan la especie culpable, lo cual es de máxima importancia al momento de elegir el tratamiento antimicótico, sobre todo en lugares donde la infección por *Candida* no-*albicans* tiene prevalencia de hasta del 50% y cuyo perfil de susceptibilidad a azoles es inadecuado (1).

La prueba ideal debe ser fácil de realizar, conllevar detección temprana de la infección, diagnosticar si es posible un amplio rango de hongos y facilitar ultimadamente la detección a nivel de especie.

La detección de 1,3-β-D-glucano es positiva para micosis invasivas, con un punto de corte de 60 pg/ml y diagnóstico definitivo en 80 pg/ml con sensibilidad de entre 60 y 100% dependiendo de muestreo secuencial y especificidad entre 83 a 99%, con falsos positivos entre 4,3 y 10%, incluyendo positividad falsa para pacientes en uso de membranas de celulosa en hemodiálisis, tratamiento con inmunoglobulinas endovenosas y reactividad cruzada con amoxicilina-clavulanato (5). Otras pruebas utilizadas en micología, como la prueba de galactomanano, no son positivas en casos de *Candida*.

Para *Candida* se ha aprobado la detección del antígeno manano que se encuentra mayoritariamente en la pared celular. Al respecto hay que recordar que la mananemia es transitoria y que el protocolo incluye un paso que libere el manano de los anticuerpos circulantes, lo cual es un paso crítico que puede disminuir su sensibilidad. Actualmente en las mejores condiciones la sensibilidad reportada es del 90% y sensibilidad del 95%.

Adicionalmente en el 55% de los casos la detección del manano precede en promedio 4,7 días al cultivo (5). Se trata de una prueba operador-dependiente.

Las pruebas de detección de anticuerpos por inmunofluorescencia para Ig-G dirigida contra antígenos de la fase micelial invasiva tienen una sensibilidad del 84,4% y especificidad del 94,7% lo cual se esta optimizando mediante la producción de anticuerpos monoclonales creados por el reto a modelos animales con antígenos recombinantes puros, evitando falsos positivos resultado de modificaciones post-traduccionales de antígenos propios (6).

Los métodos de detección basados en ADN ofrecen un medio potencialmente más sensible para el diagnóstico de infecciones con baja carga de gérmenes. La presencia de ADN de diversos microorganismos patógenos en la sangre de paciente infectados ha sido demostrada. La localización del microorganismo en la sangre es de valor crítico y un paso limitante para definir a partir de qué tipo de muestra se debe trabajar; es decir para microorganismos de localización intracelular la muestra ideal inicial es sangre total y el material de trabajo será el concentrado de glóbulos rojos y blancos, luego de centrifugación y separación del plasma. En el caso de las infecciones por *Candida spp.* no existía claridad acerca de la muestra de trabajo inicial para optimizar la localización y posterior purificación de ADN micótico. Hasta el momento diversos protocolos de PCR realizados en líquidos corporales para detectar ADN de *Candida* han producido resultados algunos satisfactorios y otro no tan alentadores (7). Investigaciones previas han logrado concluir que se puede optimizar la extracción de ADN si se trabaja a partir de muestras de plasma y suero al contrario de los se podría pensar pues la *Candida* al realizar centrifugación estaría a mayor densidad en la fracción celular de la sangre, pues se han tenido mejores resultados de muestras centrifugadas y libres de células por fenómenos de liberación de ADN de *Candida* en forma fisiológica durante la fungemia.

En otros estudios la PCR carece de sensibilidad cuando se realiza de muestras de sangre o suero; y en respuesta a esto se han implementado métodos, algunos basados en la detección radioisotópica, lo cual es por ende de riesgo para el laboratorista e implica alta complejidad.

Es de anotar que entre los casos de candidemia sospechada con hemocultivos negativos, un protocolo de PCR nidada basado en la amplificación de ADN ribosomal fue positivo para el 56% de ellos, correlacionado esto con solo el 60% de pacientes con títulos de anticuerpos positivos, pero correlacionado en 100% con el cultivos en 1 o más sitios anatómicos, con una sensibilidad teórica de menos de 1 célula por mililitro y la ventaja de detectar células no viables lo cual la pone a la cabeza como método de detección temprana (8). Nuestra intención es estandarizar la técnica de extracción y purificación de ADN de *Candida spp.* para posterior amplificación por PCR de genes específicos. Según conceptos teóricos

llevados a la práctica, la sensibilidad puede ser mejorada hasta detectar una célula por 100 microlitros de sangre sin requerir la detección mediante sondas radiomarcadas.

Otra ventaja de los protocolos de PCR es que tienen mejor perfil para detectar infecciones por 2 o más especies de *Candida* simultáneas, lo cual se ha encontrado hasta en el 30% de los casos de infecciones diseminadas cuyo origen fue el tracto gastrointestinal (8-9).

El blanco de la PCR puede ser DNA con una o múltiples copias por genoma, teniendo gran dificultad para purificar y amplificar genes de una sola copia y por el contario teniendo mayor rendimiento con genes de múltiples copias; por ejemplo, el DNA ribosomal, tiene normalmente entre 50 a 100 copias por genoma, lo cual aumenta la sensibilidad de la prueba.

Se han reportado hasta el momento una sensibilidad de la PCR del 95% o superior, y una especificidad de 97 a 99%.

Nuestra intención es facilitar el uso de una prueba molecular para el diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo por *Candida spp.* y lograr amplificar el material genético del hongo a partir de muestras de sangre.

Recientemente con el fin de evaluar la mejora potencial al tratamiento antimicrobiano utilizando ensayos de PCR múltiplex, que identifican microorganismos en sangre involucrados en sepsis, se comparo el desenlace de los pacientes que guiaron su tratamiento basado en el resultado de hemocultivos vs el resultado de la PCR realizada de sangre total. Se logro demostrar que por cada 100 PCR realizadas en UCI se ahorran 36,4 días de antibiótico inadecuado; sin embargo otros resultados como son desenlace de mortalidad no son claramente diferentes, pues se tiene mortalidad a 30 días de 30% en pacientes con hemocultivos positivos comparado con 26,7% para aquellos con solo PCR positiva y 33,8% de mortalidad para aquellos con ambos positivos; de esto finalmente no es posible determinar diferencias , pues dentro del mismo ensayo se lograron encontrar falsos negativos importantes para la PCR así como también falsos positivos en relación con la técnica de laboratorio, haciendo también hincapié en que la positividad de la PCR no se correlaciona con la presencia de microorganismos activos (vivos). De rescatar de este trabajo está el hecho que se logró amplificación de 5 especies de *Candida spp*, a partir de sangre total pero con resultados bastante disímiles puesto que hay un total de 4 amplificaciones exclusivas para PCR, 3 resultados positivos solo para hemocultivos y 6 resultados positivos en ambos métodos con lo cual se puede tener solo igual sensibilidad de la PCR comparada a los hemocultivos para candidiasis invasiva.

Conocemos igualmente que la colonización por Candida a menudo precede la infección y que la colonización de múltiples sitios es un factor de riesgo independiente para infección invasiva, el inconveniente mayor de esto es de tipo económico pues es costoso hacer tamización para hongos sistemática en todos los pacientes de UCI luego de una semana de estancia.

Quizás lo más importante del índice de colonización sea que la ausencia de al menos 2 sitios colonizados es un predictor preciso de no infección por *Candida* con valor predictivo negativo de 100%.
Nuevamente León, de forma prospectiva esta vez y publicado en el 2009 demuestra que el mejor predictor para candida invasiva es el score de *Candida* positivo sumado a un marcador surrogado como lo es el d-glucano; sin embargo, continua siendo válido dar tratamiento preventivo a los pacientes con score por encima de 3 como lo hemos planteado previamente como herramienta de selección para toma de muestra y de esta forma hacer diagnostico rápido y preciso , lo cual se verá reflejado en tratamiento oportuno y con espectro adecuado.

Uno de los problemas que limitan la sensibilidad de las pruebas por PCR para hongos levaduriformes es la presencia de una pared celular gruesa y resistente a los protocolos habituales de lisis celular, de tal forma que la liberación del ADN genómico se disminuye y por tanto la extracción efectiva y purificación de ADN son claramente inferiores a los logrados con microorganismos que no poseen pared celular. Conocido este aspecto fundamental de barrera mecánica y factor decisivo para la extracción óptima de ADN se requiere un método efectivo por el cual se logre lisis celular aumentando la disponibilidad de ADN puro e integro en ausencia de inhibidores de PCR, fácil y rápida de desarrollar.

Los protocolos tradicionales de extracción de ADN de células micóticas son muy extensos en tiempo y muestran pobre liberación de ADN comparado a los métodos de extracción de ADN de células humanas, bacterias o virus. Otros protocolos requieren pasos adicionales de lisis como la disrupción mecánica, zonificación, exposición química, digestión enzimática, entre otros. Los métodos de exposición a enzimas proteolíticas se utilizan para deteriorar la integridad de la pared celular, convertir las levaduras a una forma débil llamada esferoplasto que contiene ADN cubierto por una membrana débil que es francamente susceptible a las técnicas de destrucción de proteínas para liberación de ácidos nucléicos y posterior purificación.

Se conocen por los menos tres tipos de enzimas con capacidad de lisis superior al 75-90% de lisis de la pared celular y que preservan la integridad del ADN liberado, lo cual es requerido para el posterior análisis y amplificación por técnicas de PCR.

Es probable que dicha dificultad técnica a la hora de trabajar con levaduras, constituye la principal limitante para mejorar la sensibilidad de una prueba diagnostica basada en ADN.

De las enzimas disponibles podemos mencionar la proteinasa K, la liticasa y la zimoliasa las cuales se encargan de identificar y destruir glucanos, constituyentes esenciales de la pared celular; sin embargo, se requiere la exposición previa a agentes osmóticos, detergentes, entre otros que alteren la estructura tridimensional de las proteínas y de esta manera facilitar la acción de las enzimas mencionadas.

Los métodos de amplificación por PCR de ADN desarrollados hasta el momento no son lo suficientemente sensibles cuando se trabaja a partir de muestras de fluidos y líquidos corporales potencialmente infectados, y esto ha sido subsanado mediante el precultivo de muestras clínicas, lo cual desde el punto de vista tiempo no confiere ventajas y a la postre aumentaría costos.

Existen hoy en día en el mercado múltiples kits desarrollados que facilitan y agilizan la extracción de ADN de bacteria y hongos, los cuales aumentan de forma ostensible los costos y cuando se han comparado versus los métodos tradicionales extracción y purificación de ADN son por lo menos 10 a 100 veces menos sensibles al trabajar con muestras clínicas.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio: Estudio experimental de desarrollo de una prueba molecular para aplicar en muestras de sangre periférica.

Tipo de pacientes: Pacientes críticamente enfermos en Unidad de Cuidado Intensivo con alto riesgo para el desarrollo de candidiasis invasiva. Debido a que hasta el momento no hay ninguna regla de predicción de aplicación clínica ampliamente validada para candidiasis invasiva y las disponibles no superan una captación de más del 40% de candidemias; aquellos pacientes que reúnan los criterios clínicos de acuerdo a la escala de León, esto es puntaje superior a 3 según dicha puntuación. También serán candidatos ideales aquellos pacientes con al menos 1 hemocultivo positivo para *Candida spp*. y en quien no se haya iniciado manejo antifúngico. Para identificar los pacientes en riesgo se utilizará la escala de

puntaje de Candida desarrollada por León y sus colaboradores. Esta escala tiene las siguientes variables:

Tabla 1

Variable	Puntaje
Cirugía al ingreso a UCI	1
Sepsis severa	2
Nutrición parenteral total	1
Colonización por Candida	1

La escala se considera positiva cuando el puntaje es mayor o igual a 3.

Procedimiento:

Con el consentimiento informado y firmado por el paciente o acudiente legal, se procederá mediante venopunción a la recolección de sangre (usualmente en conjunto con las muestras de rutina tomadas por el laboratorio).

Las muestras deben ser recolectadas en tubos de vacio con aditivo anticoagulante de EDTA; dichas muestras serán refrigeradas inmediatamente a 4 grados centígrados ó mantenidas en ambiente cerrado con hielo seco para asegurar cadena de frio y llevar al laboratorio de análisis en el transcurso de no más de 24 horas.

Al llegar al laboratorio las muestras serán sometidas a proceso de lisis de glóbulos rojos y leucocitos así como remoción de enzimas del plasma con potencial de degradación del ADN. Se debe valorar la técnica de lisis centrifugación que se realiza previo al método de cultivo

actual, pues este puede ser optimizado para nuestro fin. Este proceso se realizará mediante protocolo que incluya saponina u otro detergente y proteinasa K o un protocolo similar que asegure limpieza de la muestra sin degradación del ADN genómico.

La purificación posterior del ADN puede incluir el paso por una columna de nitrocelulosa y uso secuencial de fenol y cloroformo según se estandarice.

Al tener la muestra purificada de ADN se procederá al protocolo de PCR según se estandarizo en estudio previo (Estudio sin publicar) que dio rendimiento óptimo con sensibilidad a partir de cultivo del 100% y especificidad del 100% al corroborar mediante análisis de secuencia y comparado con la tipificación estándar del protocolo API 20C AUX cuya especificidad es menor. Esta vez se realizará a partir de muestras de sangre.

Los primers a utilizar son: 2 primers universales CTSF (5'-TCGCATCGATGAAGAACGCAGC-3') y CTSR (5'-TCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar la región ITS 2 entera. Luego se utilizaran primers específicos para 9 especies de *Candida* anidados en el extremo 3´.

Las condiciones de PCR serán las determinadas en este mismo estudio.

Los resultados se consideran positivos con la aparición de una ó varias bandas de ADN marcado con bromuro de etidio, del tamaño esperado y visualizado con luz ultravioleta en comparación con marcadores de tamaño molecular de 100 pares de bases de ADN.

Según los datos obtenidos y la comparación de su rendimiento versus el rendimiento del hemocultivo, se realizara el análisis posterior de utilidad, esto incluye revisión sistemática del tema, determinación de datos estadísticos teóricos de sensibilidad y especificidad al menos y análisis costo:beneficio para planear un estudio mayor en pacientes críticos de comparación de técnicas diagnósticas en candidiasis invasiva.

RESULTADOS ESPERADOS.

1. Definir el protocolo de una prueba de diagnóstico molecular por PCR para candidiasis invasiva, que sea útil con muestra clínicas de sangre para poder realizar posteriormente la determinación de su sensibilidad y especificidad en campo.

2. Realizar actividades de investigación básica de aplicación clínica que permitan la promoción de postgrado como parte integral de la formación de Especialidad en Medicina Interna.

RESULTADOS

Se ha logrado la aprobación por los comités científico y ético del Hospital de La Samaritana, E.S.E, además se realizó la gestión administrativa con la entidad coordinadora de una de las dos unidades de cuidado intensivo de este mismo Hospital.

Se inicio la recolección de muestras clínicas, previa firma de consentimiento informado del paciente o de su acudiente desde el día 22 de septiembre de 2009, y hasta la fecha.
En breve se han tomado 2 muestras de sangre total por venopunción simple de pacientes con candidemia diagnosticada por medio de hemocultivos convencionales.
En el laboratorio clínico del Hospital de la Samaritana E.S.E. se nos ha facilitado la tipificación de las *Candidas* aisladas a nivel de especie, dato que se ha preferido mantener cegado para los investigadores.
Cada una de las muestras se ha manipulado en el laboratorio clínico, atendiendo normas de bioseguridad, asepsia, antisepsia. Como paso inicial se somete a centrifugación las muestras equilibradas a 1000-2000 revoluciones por minuto rpm, para facilitar la separación del plasma requerido para posterior análisis.
Luego de la separación por aspiración del plasma, cada una de las muestras se rotula y sella para su mantenimiento en congelación a -20 grados centigrados.
Al día siguiente de recolección se ha asegurado el trasporte de las muestras hasta el laboratorio de biología molecular, manteniendo la debida cadena de frío evitando la degradación térmica del material genético contenido. Se ha dispuesto un sitio de almacenamiento común con el debido marcado y conocida ubicación de las muestras propias del proyecto.
Se ha considerado por parte de los investigadores un mínimo de muestras de 10 pacientes para realizar el análisis molecular previamente especificado por técnica de PCR nidada.
El número de muestras es el que se considera adecuado para lograr la estandarización de la técnica de biología molecular.
El manteniendo del ciego de los investigadores para el resultado de los estudios de microbiología se cree conveniente para darle validez interna a la prueba y poderla utilizar como prueba piloto cuya utilidad clínica se establecerá en análisis posteriores de campo.

A el momento no es posible el análisis inmediato de las muestras clínicas, pues se quiere hacer el experimento consecutivo de las muestras en su totalidad y no se han adquirido algunos reactivos específicos susceptibles de degradación; por tal motivo, las muestras almacenadas corresponden a plasma y no se almacenan muestras de sangre total que

sufren un rápido proceso de degradación del ADN, el cual se quiere obtener en buenas condiciones para su análisis.

Bajo las condiciones de almacenamiento y cadena de frío adecuados se asegura la integridad del ADN por más de un año.

De acuerdo al amplio análisis de los diversos protocolos de extracción de ADN genómico de levaduras y las diversas formas disponibles de optimizar las técnicas de PCR, hemos formulados un protocolo unificado que logrará subsanar las debilidades de investigadores anteriores con respecto a una baja sensibilidad, lograremos un diagnostico rápido y oportuno que permitirá el pronto inicio de antimicóticos y dispondremos de la suficiente especificidad y tipificación a nivel de especie de nueve de las más relevantes y de importancia clínica especies de *Candida*.

El protocolo involucra utilizar muestras de plasma o suero, hacer predigestión con un buffer de lisis, digestión enzimática a altas concentraciones de proteinasa K, precipitación de proteínas por métodos químicos, la no utilización de agentes volátiles en los pasos de purificación y la posterior amplificación por PCR de genes propios de *Candida spp.* y un paso adicional de PCR nidada con cebadores específicos de nueve de las especies clínicamente relevantes de *Candida spp.* lo cual esperamos logre la máxima sensibilidad y especificidad para ser probada y comparada con los métodos actúales de diagnostico manteniendo un bajo costo.
En breve el protocolo consiste en:

1. Extracción por venopunción simple de 5ml de sangre.
2. Centrifugación de la muestra a 1000 rpm por 1 minuto.
3. Tomar el sobrenadante de plasma, evitando la interfase celular.
4. Trabaje con 1 ml de plasma obtenido por este método.
5. Para un rápido diagnostico procese las muestras de inmediato, de lo contrario guarde esta muestra a -20 grados centígrados.
6. Centrifugue la muestra de plasma a 3500 rpm durante 5 minutos.
7. Descarte el sobrenadante.
8. Redisuelva el pellet en 750 microlitros de buffer de lisis (50 milimolar tris-HCl pH 7.2, 50m milimolar EDTA, 3% SDS, 1% de beta-mercaptoetanol).
9. Incube a 65 grados centígrados por 1 hora.
10. En este momento adicione proteinasa K 1miligramo por mililitro de solución y deje en baño maría de 50 grados centígrados por 3 horas si es posible en agitación permanente.
11. Enfríe al ambiente.
12. Adiciones 0.8 volúmenes de acetato de sodio 3 molar pH 5.2, seguido de igual volumen de isopropanol absoluto.
13. Mezcle por inversión durante 2 minutos.
14. Centrifugue a 10000 rpm durante 15 minutos.
15. Descarte el sobrenadante.
16. Lave el pellet una vez con etanol al 70% y centrifugue nuevamente en iguales condiciones.
17. Retire el sobrenadante.

18. Deje secar a temperatura ambiente o al vacio a 50 grados centígrados por 50 minutos.
19. Resuspenda el pellet en 50 microlitros de buffer TE.
20. Tome para cada reacción de PCR un tubo de PCR de 0.2 mililitros, para una reacción con volumen total de 10 microlitros, conteniendo buffer de PCR 1X, una unidad de Taq DNA polimerasa, 10 p mol de cada uno de los primers CTSF y CTSR, 5 microlitro del DNA extraído en el paso anterior y 0.1 mM de cada uno de los desoxinucleosido trifosfato.
21. Después del primer paso de amplificación 1 microlitro del producto es amplificado usando el primer reverso inicial CTS1R y un primer especie específico en 9 tubos separados para cada especie de *Candida spp.* a ser detectada.
22. Para cada PCR seminidada la mezcla de reacción consiste de buffer de PCR 1X, una unidad de Taq DNA polimerasa, 5 pmol de CTSR, junto con 5pmol de cada uno de los primers especie específicos, 1 microlitro del primer producto de PCR, y 0.1 milimol de cada dNTP.
23. Las condiciones de PCR son las siguientes: denaturación a 94 grados centígrados por 1 minuto, anillaje a 60 grados centígrados por 30 seg. Y extensión a 72 grados centrigrados por 1 minuto. Incluya un paso inicial de denaturación a 94 grados centígrados por 3 minutos y un paso final de extensión a 72 grados centígrados por 10 minutos.
24. Realice 30 ciclos de la primera PCR seguido por 20 ciclos de la PCR seminidada.
25. Para detectar los fragmentos de ADN amplificados realice una electroforesis en gel de agarosa en comparación con marcadores de peso molecular para cada una de las muestras y determine la línea amplificada que definirá la especie.

La sensibilidad esperada según los conceptos teóricos debe superar el 80% y la especificidad será cercana al 100% con la capacidad de identificar 9 especies de *candida spp.* clínicamente relevantes.

CONCLUSIONES

Las limitaciones de los sistemas de hemocultivo para la detección de fungemia han llamado la necesidad de desarrollar métodos alternativos, rápidos, sencillos y precisos. La PCR nidada a partir de ADN extraído por métodos de lisis y purificado mediante precipitación tiene mejor desempeño que los hemocultivos y más aún si se realiza con base en plasma o suero logrando una detección acelerada y especiación del patógeno causal hasta por cuatro días.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arjuna N.B. Ellepola1,2 and Christine J. Morrison1, Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis. The Journal of Microbiology, February 2005, p.65-84.

2. Garey KW, Rege M, Pai MP et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. Clin Infect Dis 2006; 43: 25–31.

3. Peter G. Pappas, MD. Invasive Candidiasis. Infect Dis Clin N Am 20 (2006) 485–506.

4. Berenguer J, Buck M, Witebsky F, et al. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of proven invasive candidiasis: disseminated versus single organ infection. Diagn Microbiol Infect Dis 1993;17:103–9.

5. Fasahat F Alam, Abu S Mustafa and Zia U Khan*. Comparative evaluation of (1, 3)-β-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC Infectious Diseases* 2007, 7:103.

6. Ana La´ın,1 Natalia Elguezabal,1 Elena Amutio,2 I ˜ nigo Fern´andez de Larrinoa,3 Mar´ıa DoloresMoragues,4 and Jos´e Pont´on1. Use of Recombinant Antigens for the Diagnosis of Invasive Candidiasis. Clinical and Developmental Immunology Volume 2008, Article ID 721950, 7 pages.

7. P. Lewis White,* Richard Barton,† Malcolm Guiver,‡ Christopher J. Linton,§ Steve Wilson, Melvyn Smith,_ Beatriz L. Gomez,** Michael J. Carr,†† Patrick T. Kimmitt,‡‡ Shila Seaton,** Kumar Rajakumar,‡‡ Tessa Holyoake,§§ Chris C. Kibbler,** Elizabeth Johnson,§ Richard P. Hobson,† Brian Jones, and Rosemary A. Barnes*. A Consensus on Fungal Polymerase Chain Reaction Diagnosis?. *Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 8, No. 3, July 2006.*

8. Suhail Ahmad, Zaiba Khan, Abu S. Mustafa, and Zia U. Khan*. Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: Comparison with Culture, Antigen Detection, and Biochemical Methods for Species Identification. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2002, p. 2483–2489.

9. RETNO WAHYUNINGSIH,1,2* HANS-JOACHIM FREISLEBEN,2 HANS-GU¨NTHER SONNTAG,3 AND PAUL SCHNITZLER4. Simple and Rapid Detection of *Candida albicans* DNA in Serum by PCR for Diagnosis of Invasive Candidiasis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 2000, p. 3016–3021.

10. Resolucion 8430 de 1993 del mMinisterio de Salud de Colombia-.

11. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW: Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 2001, 33(5):641-647.

12. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP: Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999, 29(2):239-244.

13. 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):309-317.

14. Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB, Yu KW, Fan YH, Hsieh KS, Ho M *et al*: Risk factors for fatal candidemia caused by Candida albicans and non-albicans Candida species. *BMC Infect Dis* 2005, 5(1):22.

15. Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S, Harrison LH, Seaberg EC, Hajjeh RA, Teutsch SM: Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005, 26(6):540-547.

16. Pfaller MA, Diekema DJ: Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* 2002, 40(10):3551-3557.

17. Lopez C, Giro L, Ramos L, Ramadan S, Bulacio L: [Comparison of different methods for species identification of genus Candida]. *Rev Argent Microbiol* 2005, 37(1):16-21.

18. 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):2483-2489.

19. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN: In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against Candida species infrequently isolated from blood. *Journal of clinical microbiology* 2003, 41(1):78-83.

20. Sullivan D, Coleman D: Candida dubliniensis: characteristics and identification. *Journal of clinical microbiology* 1998, 36(2):329-334.

21. Fujita S, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ: Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from Candida species in blood. *Journal of clinical microbiology* 1995, 33(4):962-967.

22. FastPCR, PCR primer design, DNA and protein tools, repeats and own database searches program [http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm]

23. Resende JC, de Resende MA, Saliba JL: Prevalence of Candida spp. in hospitalized patients and their risk factors. *Mycoses* 2002, 45(8):306-312.

24. Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M *et al*: Epidemiology and predictors of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of clinical microbiology* 2005, 43(4):1829-1835.

25. Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ, Kelly SL, Sanglard D, Coleman DC, Sullivan DJ: Molecular mechanisms of itraconazole resistance in Candida dubliniensis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(8):2424-2437.

26. St-Germain G, Laverdiere M: Torulopsis candida, a new opportunistic pathogen. *Journal of clinical microbiology* 1986, 24(5):884-885.

27. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP, Hanazawa R, Latge JP, Lortholary J, Makimura K *et al*: Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol* 1998, 36 Suppl 1:249-257.

28. Ellepola AN, Hurst SF, Elie CM, Morrison CJ: Rapid and unequivocal differentiation of Candida dubliniensis from other Candida species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol* 2003, 18(6):379-388.

ANEXOS

CONSIDERACIONES ÉTICAS

A los pacientes seleccionados e involucrados en el estudio se les tomará una muestra de sangre adicional (es decir, aparte de las muestras requeridas por su condición clínica y aparte de las necesarias para hemocultivo), de aproximadamente 10 mililitros, concomitante con las muestras clínicas necesarias. El riesgo de tal intervención es el mínimo por lo cual se solicitará a las instituciones investigadoras que el consentimiento informado se obtenga a partir del acudiente por escrito (10). Los resultados del ensayo de laboratorio no influirán sobre la práctica clínica debido a que este resultado debe ser positivo en el laboratorio de la Institución para que sea procesado por técnicas moleculares.

IMPACTO

Ambiental: Durante la realización de este estudio no se tienen previstos ninguna intervención ó impacto ambiental, pues no se incidirá en el tratamiento antifúngico del paciente y por lo tanto no habrá presión sobre las especies micóticas propias y colonizantes que podrían modificarse.

Pertinencia social: la meta de este estudio, es demostrar en un estudio piloto la utilidad de las muestras clínicas de sangre para el diagnóstico rápido por PCR de candidiasis invasiva. Con los resultados obtenidos se planeará estudio mayor para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba en comparación con las pruebas de diagnóstico actualmente disponibles en el mercado. Los pacientes con candidiasis invasiva que no reciben tratamiento oportuno y acertado resultan en aumento de costos de hospitalización por complicaciones tardías de la infección y estancia prolongada, además del riesgo de mortalidad.

Aporte a la educación: en primer plano, este trabajo y su análisis servirán para la promoción de un estudiante de la Especialidad de Medicina Interna de la Universidad Nacional de Colombia y se vincularán docentes de la universidad. Además se espera incluir este estudio dentro de la línea de investigación en micosis del Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina de la Universidad. Los resultados de este estudio tendrán inmediata difusión entre los estudiantes de medicina de pregrado y posgrado de medicina interna e infectología. Este estudio será presentado en eventos de investigación

locales con el fin de dar a conocer la información a otros grupos médicos y especialistas interesados en el tema.

Aporte a la ciencia y tecnología: se considera se trata de un estudio innovador en el campo, en donde no hay estándar de predicción, ni de diagnóstico, en una afección de alto impacto sobre morbimortalidad para los pacientes. Se espera que los resultados sean positivos y de utilidad para el diagnóstico rápido de candidiasis invasiva y así depurar la prueba diagnóstica ofrecida desde el campo de la biología molecular aplicada. Se estima que los resultados y su análisis puedan ser plasmados en un artículo de investigación como trabajo de grado de la especialidad de medicina interna y enviado a una revista científica internacional, en conjunto con los datos del desarrollo de la prueba.

Productividad: A largo plazo se plantea que dar el diagnóstico preciso y rápido de candidiasis invasiva determine cambios en los protocolos clínicos de diagnóstico de esta enfermedad, que se traduzcan en menores costos de hospitalización al evitar complicaciones determinadas por el avance no previsto de dicha infección y eventualmente, en tratamientos más oportunos con disminución de la morbilidad y mortalidad de la población afectada.